

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**Terapia génica y celular para la corrección de la Lipodistrofia
Congénita Generalizada**

Rosa María Moro Muñoz

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**Terapia génica y celular para la corrección de la Lipodistrofia
Congénita Generalizada**

Vº Bº directores de tesis.

Fernando Larcher Laguzzi

Rodolfo Murillas Angoit

Rosa María Moro Muñoz
Madrid, 2014

El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en la División de Biomedicina Epitelial del Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), bajo la dirección de los Dres. Fernando Larcher Laguzzi y Rodolfo Murillas Angoití.

A mis padres.

A mi hermana Elena.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi director de tesis, Fernando, por ofrecerme la oportunidad de formar parte de su grupo durante estos años y de realizar mi tesis doctoral. Gracias por todo lo que me has enseñado durante este tiempo, por tu apoyo y por haberme brindado la posibilidad de visitar otros lugares donde he podido conocer diferentes formas de trabajar y gente de la que también he aprendido mucho. Gracias también a Marcela, por seguir viéndome con el mismo cariño que hace muchos años.

Por supuesto, gracias a mi otro director de tesis, Rodolfo, por enseñarme tantas cosas en el laboratorio, especialmente por los clonajes y las SOE-PCRs, por hacerlos más fáciles y divertidos, y por tener una técnica alternativa para casi todo. Pero sobre todo, gracias por tu confianza en mí, por animarme siempre a pensar por mí misma y a expresar abiertamente mi opinión, fuera la que fuera. Ha sido un placer compartir contigo ideas, opiniones, risas, preocupaciones y cafés al sol.

El agradecimiento más especial y que espero haber demostrado durante estos años, a mis compañeras y amigas de laboratorio. Vosotras sois una parte imprescindible y esencial de esta tesis; vosotras habéis hecho que este tiempo haya tenido un color y un sabor único, y que nunca me haya sentido sola a lo largo de este camino. A Blanca, especialmente, porque no puedo recordar un día en el que no te hayas ofrecido a ayudarme con cualquier cosa, por animarme siempre, por tu complicidad, tu coherencia, tu sentido del humor y por ser tú, que eres única. A Eli, el mejor *regalo* que pude tener a los pocos meses de entrar al CIEMAT, por ser mi compañera de preocupaciones, alegrías, logros y fracasos. Por ser una gran amiga siempre pendiente de mí, en cada etapa de estos años, dentro y fuera del laboratorio. Por compartir conmigo trabajo, aficiones, deporte, fiestas, conversaciones y por enseñarme a ser mejor persona. Por encontrar siempre una solución para cada problema y, si no, inventarla. A Carol, que siempre ha seguido presente en el labo pequeño aunque ya no estuviera, por esos años de despistes compartidos, por la alegría y frescura que le dabas al día a día y por seguir teniéndote ahí fuera. A Sara, por tantos momentos buenos y divertidos compartidos, por las conversaciones más locas y porque sé que puedo contar contigo, en lo científico y en lo que no lo es. A Nuria, mi compi “de atrás”, por tus consejos, tu apoyo, tu cariño y tu diferente forma de ver las cosas. A Marta García, por ayudarme con las secuencias y PCRs, por ser tan positiva y tan alegre, por sonreír tanto cada día y por estar siempre dispuesta a compartir un rato fuera del labo. A Marta Carretero, gracias por tus enseñanzas con las RT-PCR, me han servido mucho y las he disfrutado. Por tus consejos y opinión sobre cosas que a veces las más pequeñas no *pillamos* y por interesarte por cómo va mi tesis. A Luisa, gracias por esforzarte en explicarme cómo funciona el laboratorio de histología y procesar con cariño mis muestras, por muchas risas y conversaciones de café. A Lucía, por la primera etapa de tesis como compañeras de labo, y por tu

interés posterior aunque estuvieras en otro sitio. A M^a José, por preocuparte por qué haré en el futuro y por mi tesis y, como olvidarlo, por “salvarme” con el Endnote! A Almudena, a quien me alegro de haber tenido la oportunidad de conocer un poco más con el tiempo y que siempre es un apoyo en cultivos. A Ángeles, gracias por tu ayuda con las PCRs y las lecturas de secuencias, me ha encantado aprender de ti y disfrutar de tu original sentido del humor. A Cris, por ser una nueva compañera con la que compartir ideas, espero que te vaya muy bien! A David Almarza, por prestarme su tesis como referencia para cuando escribiera la mía, y por algunos de sus consejos. A Nati, con la que hubo buenos momentos el poco tiempo que compartimos en el CIEMAT. A otros compañeros que estuvieron en el CIEMAT y ya no están, pero que han aportado cosas muy buenas al grupo: Sergio, Ross y Chema. Se os echa de menos.

También me gustaría agradecer a otras personas del CIEMAT que de alguna forma han contribuido a que esta tesis esté aquí. A Óscar Quintana, por enseñarme mucho sobre las iPS, por su paciencia e interés. A Rosa Yáñez, por cedernos amablemente sus células mesenquimales y por sus útiles consejos. A otros becarios con los que he compartido buenos momentos: María García, Rocío, Javi, Sandra, Vicki, Olga, Jose chica, Ariza, Cloti, Cristina. Al personal de histología: Kiko y Pilar. A Sole, Sergio, Aurora y Mamen, por estar siempre dispuestos a ayudar y a agilizar cualquier gestión con mucho humor. A Angelines, la primera persona que conocí de ese despacho, que muchísimas veces me facilitó el trabajo y a quien siempre recordaré con un gran cariño. A todo el personal de limpieza y apoyo del edificio 70, que hacen que el trabajo de los demás sea posible y de mejor calidad.

Por otro lado, tengo que agradecer a personas de otros centros de investigación su aportación a esta tesis. Al Dr. Enrique Sáez, por permitirme compartir con su grupo unos meses en su laboratorio, en San Diego. Por invertir tiempo en mi formación, por ofrecerme la posibilidad de conocer otras técnicas, otros enfoques y muchas personas encantadoras. Por sus divertidas visitas a España, en las que ya no parece un jefe tan serio. A Cristina Godio, la persona que me *cuidó* y enseñó mucho durante ese tiempo, gracias por tu dulzura y dedicación. A Eduardo Domínguez, por brindarme su apoyo de paisano al otro lado del Atlántico. A Adrian Papas, por los fantásticos momentos que compartimos en el lab, en los billares... a todos ellos por hacer de esa estancia un viaje único y maravilloso.

A la Dra. Rosario Domingues de Aveiro, Portugal, por abrirnos su laboratorio para trabajar en él una temporada. Gracias por todo lo que me enseñaste, por tu cariño y por mostrarme la bonita tierra en la que vives. Gracias también a Betta, por todo tu apoyo y amabilidad durante ese tiempo.

Y como esta tesis no existiría sin ellos, quisiera darles las gracias a todos los pacientes con lipodistrofia por la lucha que mantienen contra esta enfermedad y por confiar en nosotros a la hora de contarnos sus experiencias, compartir su tiempo e incluso donar sus células, sin las cuales no

podríamos llevar a cabo nuestros experimentos. En especial, me gustaría agradecer a Elena por toda su colaboración y por el tiempo que compartimos en el congreso de Totana. También a los demás pacientes que pude conocer allí y a sus familiares, que me trataron con muchísimo cariño y me hicieron sentir como en casa. A Maca y Juan, los impulsores de ese evento y a los que tuve el privilegio de conocer esos días, por ser tan fuertes, luchadores y cercanos.

Fuera del ámbito científico, debo de agradecer fundamentalmente a mis padres, por apoyarme en cada momento de esta tesis y de mi vida, por dejarme volar sin miedo, por querer que siga mis ideas y mis sueños sin juzgarme, y por ofrecerme la posibilidad de vivir siempre en un entorno de libertad, en todos sus sentidos. Por no poner barreras a nada y por ser el principal pilar de mi vida. En esto está incluida Elena, mi hermana, amiga y compañera de vida, la persona con la que más experiencias he compartido; la más luchadora y a la que más admiro. Gracias por estar siempre ahí para todo, por formar las 2 un equipo único. A Seydou, por traer ritmos cálidos y exóticos a nuestra familia, por ser tan bueno y cariñoso y preocuparte tanto por tu cuñada. *Thank you man!*

A David, mi gran descubrimiento americano, gracias por cruzarte en mi camino y decidir caminarlo junto a mí. Gracias por aguantarme, especialmente en esta etapa de nervios e incertidumbres, por ser el mejor compañero *de viaje*, por aceptarme tal y como soy. A toda tu familia de México y EE.UU, por tratarme con tantísimo cariño y por el apoyo que nos brindan.

A mi tío Eligio, por estar siempre con nosotros, en los buenos y malos momentos, y por ser tan original y genuino. A mi familia de Segovia, especialmente Carlos, Alfonso y Héctor, por hacer que no me olvide de los orígenes, por permitirme formar parte de otro mundo diferente y maravilloso, y por enseñarme lo que es realmente el trabajo bien hecho. A mis 4 abuelos/as, a los que quiero mucho y de los que no me olvido, aunque ya no estén por aquí.

Gracias también a mi otra familia, la que no es de sangre, pero que es igual de importante: Lola, Fortu, Adri y Martita. Mis segundos padres y hermanos, sabéis lo importantes que sois para mí. Gracias por acompañarme, educarme y apoyarme durante toda mi vida. Esta tesis es también vuestra. A Adrián, con todo mi cariño, a quien siempre quise, admiré y a quien jamás olvidaré. Siempre estás aquí entre los que te queremos, en cada sonrisa y recuerdo.

A María y Carmen, otra parte muy importante de la familia, que le dan alegría y sabor a cada momento que compartimos. Por seguir de cerca mis pasos desde que empecé a darlos, por estar siempre en los momentos importantes, por ser tan rebeldes e inconformistas.

A mis amigos/as de toda la vida, por aguantarnos tantísimos años y seguir queriendo compartir buenos y malos momentos. A Patri, por los encuentros y desencuentros, por estar siempre ahí para hablar lo que haga falta y para pasar un rato bonito y divertido. Por ser un apoyo importante que nunca desaparece y porque sigan saltando a veces chispas por ese carácter tan parecido que

tenemos. A Laura Benito, porque en todos mis recuerdos estás tú, por Las Naciones y todo lo posterior, por ser tan comprensiva y paciente conmigo y conseguir siempre que se me pase tan rápido cualquier enfado. A Ernesto, mi *brother*, mi compañero de mil y una aventuras, por soñar juntos, por pensar que todo es posible, por estar ahí a pesar de la actual distancia. Por ser un luchador y perseguir siempre tus sueños, y por poner la mejor banda sonora a la vida de los que te tenemos cerca. A Aurora, mi eterna compañera de todo, desde pequeñas, por las miles de vivencias compartidas, por los buenos, malos y subrealistas momentos que hemos pasado y porque se repitan. Gracias a Silvia, por ser una persona única e irrepetible, por preocuparte por mis experimentos y por mí, y por ser una gran amiga. A Paula, otra buena amiga, por las locuras comunes, por Alcossebre, Bilbao, Calahonda...por ser original y serlo cerca de mí. A mis amigos/as segovianos: Cris, gracias por ser la más auténtica persona que conozco, por estar absolutamente siempre que te necesito y por tener la mente tan abierta y soñadora. Por tu comprensión y por lo muchísimo que nos reímos juntas. A mi Lauri, por aquellos maravillosos años de merendolas, excursiones al pinar, bicicletas etc y por todos los que han pasado hasta ahora. Por ser tan buena y cariñosa y seguir creciendo juntas. Al resto de mis amigos de Pinarejos City: Julio, Javi, Mari, María, Alicia, Rubén, Iván, Jose, Carlos, Berna, Toño Ana, Marina... por enseñarme la *cultura de bar* y lo fácil que es divertirse cuando tienes a la gente adecuada alrededor.

A mis 2 amigas más antiguas, Ana y Marta, juntas desde la guardería, casi me parece imposible! Por haber conseguido superar cada etapa de nuestra vida juntas y seguir siendo las 3 mismas enanas soñadoras que jugaban en los parques de Prospe.

A Alejandra, la canaria a la que más quiero, con quien comencé mi andanza bioquímica. Gracias por compartir conmigo tu amistad y esta carrera, tú has hecho que sea menos dura y mucho más apasionante.

A Jimena, por nuestro año bilbaíno, por las 7 calles, los zuritos, los pintxos, la convivencia y por seguir caminando juntas ahora por las calles de Madrid.

A TODOS, GRACIAS.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	13
1. El tejido adiposo	15
1.1. Tejido adiposo marrón	15
1.2. Tejido adiposo blanco	16
1.3 Tejido adiposo como órgano endocrino	17
1.3.1-Leptina	17
1.3.2-Adiponectina	19
1.3.3-Resistina	20
1.4 Adipogénesis: precursores, etapas y factores implicados	20
1.4.1-PPAR γ	22
1.4.2-Familia de proteínas C/EBP	24
1.4.3-aP2	25
1.4.4-Otros factores	25
1.4.5-Mecanismo molecular de la adipogénesis	25
1.5 Sistemas modelo de adipogénesis <i>in-vitro</i>	26
2. Enfermedades del tejido adiposo	28
2.1 Lipomas	28
2.2 Lipomatosis	29
2.3 Lipodistrofias	29
2.3.1-Lipoatrofias	30
3. Lipodistrofia Congénita Generalizada	30
3.1 Características	30
3.2 Genes implicados en la LCG	30
3.3. Implicación de los genes causantes de lipodistrofia en el mecanismo de la adipogénesis	32

3.4 Tratamiento de la lipodistrofia	33
3.4.1 Tratamiento de las LD con leptina	34
3.4.2 Terapia génica	35
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Cultivos celulares	43
1.1 Cultivo de fibroblastos humanos	43
1.2 Cultivo de células mesenquimales humanas	44
2. Diferenciación adipogénica de fibroblastos dérmicos humanos y tinción <i>Oil Red O</i>	44
3. Producción de sobrenadantes virales	45
4. Transducción celular	46
5. Experimentos de silenciamiento de AGPAT2 en MSC	46
6. Detección de leptina en el medio de cultivo celular	46
7. Extracción de ácidos nucleicos (ADN genómico y ARN)	46
7.1 ADN genómico	46
7.2 ARN	47
8. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR para diagnóstico genético de paciente de LCG de tipo 1	47
8.1 Purificación del producto de PCR	49
8.2 Secuenciación automática	49
9. PCR de Transcripción Reversa	49
10. Extracción de proteínas celulares	51
11. Western-blot	51
12. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	52
13. Extracción de los lípidos celulares por el Método Folch	53
14. Cuantificación de fosfolípidos totales	53
15. Cuantificación de triglicéridos y colesterol	53
16. Separación de fosfolípidos mediante cromatografía de capa fina	53
17. Espectrometría de masas	54

18. Preparación de equivalentes dérmicos y dermo-epidérmicos y trasplante a ratones inmunodeficientes	54
19. Administración oral de rosiglitazona a los ratones	55
RESULTADOS	57
1. Diagnóstico genético de un paciente de LCG de tipo 1	59
2. Estudios <i>in vitro</i> en células CGL tipo 1	61
2.1. Establecimiento de condiciones optimizadas de inducción de la diferenciación adipogénica de fibroblastos dérmicos humanos. Análisis comparativo de la diferenciación de células de donante sano y de paciente con LCG tipo 1	61
2.2. Expresión forzada de PPAR γ -1 como factor reprogramador de fibroblastos dérmicos	62
2.3. Inducción de la diferenciación adipogénica de fibroblastos reprogramados con el vector retroviral V-PPAR γ -1	66
2.4. Adipogénesis en fibroblastos LD reprogramados por sobreexpresión de PPAR γ -1.....	67
2.5. Correlación directa entre la sobreexpresión de PPAR γ y la formación de vesículas lipídicas en fibroblastos LD	68
2.6. Redundancia funcional de la reexpresión de AGPAT2 en fibroblastos LD cotransducidos con el vector retroviral V-PPAR γ -1 y un vector lentiviral PGK-AGPAT2	70
2.7. Análisis de la expresión de factores de transcripción característicos del tejido adiposo en MSC; HF y LD que sobreexpresan PPAR γ -1	73
2.8. Análisis de la expresión de adipoquinas en MSC; HF y LD que sobreexpresan PPAR γ -1	73
2.8.1. Determinación de los niveles de leptina humana secretada al medio de cultivo por HF y LD transducidos con PPAR γ -1 y sometidos a diferenciación adipogénica	76
2.9. Diferenciación terminal de HF y LD transducidos con PPAR γ -1	76
2.10. Estudio mediante RT-PCR de la expresión de diferentes isoformas de AGPAT en MSC; HF y LD transducidos con PPAR γ -1	77

2.11. Análisis de la señalización mediada por Akt en cultivos de HF y LD transducidos con V-PPARg-1	79
2. 12. Perfil lipídómico de células adiposas derivadas de MSC; HF y LD transducidos con PPARg-1	80
2.12.1. Identificación mediante cromatografía de capa fina de las diferentes clases de fosfolípidos presentes en los extractos lipídicos de MSC; HF y LD transducidos con PPARg-1 y diferenciados a grasa	81
2.12.2. Identificación mediante espectrometría de masas de diferentes especies de TG en extractos lipídicos de MSC; HF y LD transducidos con PPARg-1 y sometidos a diferenciación adipogénica	83
3. Estudios <i>in vitro</i> en células CGL tipo 2	84
3. 1. Caracterización del potencial adipogénico de fibroblastos de un paciente de LCG tipo 2	84
3.2. Análisis de la expresión de factores de transcripción característicos del tejido adiposo en LD2 transducidos con PPARg-1	85
3.3. Análisis de la expresión de adipoquinas en células LD2 que sobreexpresan PPARg-1	88
3.4. Análisis de la señalización mediada por Akt en cultivos de LD2 transducidos con PPARg-1	88
4. Estudios <i>in vivo</i>	89
4.1. Trasplante subcutáneo	89
4.2. Trasplante de equivalentes dermo-epidérmicos	91
4.3. Inducción de la diferenciación adipogénica de fibroblastos HF y LD aislados de los equivalentes dermo-epidérmicos trasplantados a ratón	92
4.4. Administración oral de rosiglitazona a ratones trasplantados con equivalentes dermo-epidérmicos formados por HF y LD transducidos con V-PPARg-1	93
5. Anexo	94
DISCUSIÓN	97
1. Avances terapéuticos en el tratamiento de la Lipodistrofia Congénita Generalizada	99

2. Diferenciación adipogénica <i>in vitro</i>	100
2.1. Adipogénesis inducida por el medio de cultivo	100
2.2 Adipogénesis promovida por sobreexpresión de PPAR γ	102
3. Diferenciación adipogénica de células derivadas de paciente de LCG	103
4. Caracterización funcional de los adipocitos derivados de fibroblastos dérmicos HF y LD	106
4.1 Señalización mediada por Akt en células LD	107
5. Perfil lipídico de los adipocitos derivados de fibroblastos dérmicos HF y LD	107
6. Potencial terapéutico de las células LD en la generación de sistemas cutáneos bioingenierizados para la terapia génica y celular	108
CONCLUSIONES	111
BIBLIOGRAFÍA	115

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AGPAT2	1-Acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase 2
aP2	Adipocyte Protein 2
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín Trifosfato
BSA	Albúmina Sérica Bovina
BSCL2	Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy 2
cADN	ADN complementario
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
CL	Cardiolipina
COL	Colesterol
DMEM	Dulbbeco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilendiaminotetra-acético
GFP	Proteína Verde Fluorescente
HDAC3	Histona Deacetilasa 3
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanosulfónico
HF	Fibroblastos Dérmicos Humanos
HMGIC	High Mobility Group Isoform C
IBMX	Isobutilmetilxantina
IGF-1	Insulin Growth Factor-1
IRS	Insulin Receptor Substrate
JAK2	Janus Kinase 2

KLF	Krüppel Like Factors
LCG	Lipodistrofia Congénita Generalizada
LD	Fibroblastos dérmicos de paciente LCG de tipo 1
LD2	Fibroblastos dérmicos de paciente LCG de tipo 1
LPC	Lisofosfatidilcolina
LRH-1	Liver Receptor Homolog-1
MSC	Mesenchymal Stem Cells
NIH	National Institute of Health
NPY	Neuropeptido Y
PBS	Buffer Fosfato Salino
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PGK	Fosfoglicerato Kinasa
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol-3-Kinasa
PL	Fosfolípidos
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma
PS	Fosfatidilserina
RELM	Resistin-like molecules
RT-PCR	PCR de Transcripción Reversa
RXR	Retinoid X Receptor
siARN	ARN de interferencia

SM	Esfingomielina
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TA	Tejido Adiposo
TAB	Tejido Adiposo Blanco
TAM	Tejido Adiposo Marrón
TBS	Tris Buffer Salino
TG	Triglicéridos
TZD	Tiazolidinedionas
UCP-1	Uncoupling Protein-1

RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

En este trabajo de tesis nos hemos centrado principalmente en el desarrollo de una estrategia de terapia génica y celular que permita la corrección de la Lipodistrofia Congénita Generalizada (LCG) de tipo I debida a mutaciones en el gen AGPAT2, que codifica una enzima crucial en la vía de síntesis de triglicéridos y fosfolípidos. Los pacientes aquejados de esta enfermedad carecen de tejido adiposo y, en consecuencia, sufren trastornos metabólicos graves debidos en buena parte a los bajos niveles séricos de adipoquinas, como leptina y adiponectina, sintetizadas y secretadas por dicho tejido. En nuestros experimentos se han podido establecer las condiciones necesarias para conseguir eficientemente la diferenciación adipogénica de fibroblastos dérmicos de pacientes de LCG y, por consiguiente, la corrección de la enfermedad a nivel *in vitro*. La estrategia consistió en la reprogramación celular por sobreexpresión del factor de transcripción PPAR γ -1 y el cultivo de los fibroblastos reprogramados en un medio adipogénico optimizado. En esas condiciones se consiguió, imprevistamente, activar la adipogénesis incluso en ausencia del gen AGPAT2 funcional. Así pues, a través de una batería de análisis morfológicos (adipogénesis), de expresión génica (por RT-PCR), de interferencia (por siRNA) y de expresión de proteínas secretadas pudimos demostrar que la expresión forzada de PPAR γ -1 consigue superar el defecto impuesto por la deficiencia de AGPAT2. Los resultados obtenidos evidencian que los adipocitos generados mediante esta estrategia expresan genes característicos de la adipogénesis y son capaces de sintetizar las adipoquinas adiponectina y leptina, indicadores de diferenciación adipocítica terminal. Por otro lado, el análisis del perfil lipídico de las células reprogramadas y diferenciadas muestra únicamente ligeras diferencias en las especies de triglicéridos encontradas con respecto a las de las células control, siendo el contenido de colesterol y fosfolípidos equivalente tanto a nivel cualitativo como cuantitativo en ambos tipos celulares.

Con la intención de desarrollar una estrategia de corrección terapéutica *ex vivo*, llevamos a cabo el trasplante de las células modificadas genéticamente a ratones inmunodeficientes para determinar su bioseguridad y posible efecto biológico. Los experimentos *in vivo* de esta tesis han puesto de manifiesto la capacidad de las células de paciente de LCG corregidas de permanecer de manera estable, tanto tras un trasplante subcutáneo como formando parte de un sistema organotípico complejo de equivalentes dermo-epidérmicos, sin provocar ningún efecto tóxico ni tumorigénico sobre el animal receptor.

Si bien los resultados de adipogénesis *in vivo* son aun preliminares, las propiedades de las células reprogramadas nos llevan a contemplar su uso, formando parte de sistemas organotípicos bioingenierizados, como una aproximación terapéutica para el tratamiento de la LCG que permitiría,

además de sintetizar grasa, la reposición de las adipoquinas de las que carecen estos pacientes. La comprobación *in vitro* de la eficacia de esta estrategia en células de pacientes de LCG tipo 1 y 2 permite proponer el uso de esta aproximación para la corrección de más de un subtipo de la enfermedad.

ABSTRACT

In this thesis project we have mainly focused on the development of a gene and cell based therapy for the correction of Congenital Generalized Lipodystrophy (LCG) type I, which is caused by mutations in the AGPAT2 gene, an essential intermediate enzyme in the triglycerides and phospholipids synthesis pathway. Patients who suffer from this disease lack adipose tissue and therefore, suffer serious metabolic disorders caused primarily by low serum levels of adipokines, such as leptin and adiponectin, which are synthesized and secreted by adipose tissue. Through our experimental approach, we have been able to establish the optimal conditions to efficiently achieve adipogenic differentiation of dermal fibroblasts derived from LCG patients, thereby correcting the condition at the *in vitro* level. Our strategy consisted of the reprogramming of patient derived fibroblasts by overexpression of the transcription factor PPAR γ -1 and their subsequent differentiation in an optimized adipogenic medium. Unexpectedly, under these pro-adipogenic conditions we were able to activate adipogenesis even in the absence of a functional AGPAT2 gene. By utilizing a repertoire of morphological (adipogenesis), gene expression (RT-PCR), interference (siRNA) and proteomic analysis of the secreted proteins, we found that the overexpression of PPAR γ -1 in LCG derived fibroblasts was enough to overcome the deficiency caused by a non-functional AGPAT2 in adipogenesis. Our results showed that this strategy generates LCG fibroblast-derived adipocytes with a gene expression profile characteristic of mature adipocytes. These cells are also functionally capable of synthesizing adiponectin and leptin, indicators of terminal adipocyte differentiation. Furthermore, analysis of the lipidomic profile of the differentiated reprogrammed cells showed only slight differences in the triglyceride species found in reference to control cells, having equivalent levels of cholesterol and phospholipids in both cell types.

To further evaluate our gene and cell based therapy, we performed transplantation of genetically modified cells into immunodeficient mice to determine its biosafety and possible biological side effects. The *in vivo* experiments in this thesis have shown the ability of LCG corrected cells to endure both the subcutaneous transplantation and the adaptation to a complex system such an organotypic dermo-epidermal equivalent, without causing any toxic or tumorigenic effect on the recipient animal.

Despite the preliminary nature of our *in vivo* results, the properties of the reprogrammed cells lead us to consider their use in bioengineered organotypic systems as a therapeutic approach for the treatment of LCG, by allowing fat biosynthesis and the replacement of the deficient adipokines in these patients. The *in vitro* confirmation of the efficacy of this therapy in LCG type 1 and 2 patient cells suggests its potential use for the correction of more than one subtype of this disease.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. EL TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo (TA) es un tejido conectivo especializado de origen mesenquimal compuesto por varios tipos celulares, siendo los adipocitos las células especializadas en la acumulación de lípidos y la secreción de factores específicos llamados adipoquinas. En los mamíferos hay dos depósitos mayoritarios de grasa: la grasa subcutánea, que se sitúa principalmente bajo la piel, especialmente en muslos, nalgas y abdomen; y la intra-abdominal, que comprende la grasa perirrenal, mesentérica y omental. Además de estos depósitos existen otros secundarios, como la grasa estructural, que se encuentra en las almohadillas de pies y manos, en las articulaciones o en los pómulos (Nedergaard et al., 2007)(Figura 1). En condiciones normales, el 80% del tejido adiposo está localizado en el tejido celular subcutáneo o hipodermis, mientras que el tejido adiposo interno representa menos del 20%. Éste último está formado por adipocitos de menor tamaño, con menos capacidad de almacenamiento, más vascularizado, con mayor innervación simpática y con un alto número de receptores β 3-adrenérgicos (Moreno and Martinez, 2002; Sanchez-Munoz et al., 2005).

El TA se puede subdividir en el tejido adiposo marrón (TAM) y el tejido adiposo blanco (TAB), que se diferencian tanto en su composición como en su función biológica.

1.1 Tejido adiposo marrón

Está formado por adipocitos que contienen vesículas de grasa multiloculares rodeadas de un gran número de mitocondrias, las cuales le confieren su característico color marrón. Los núcleos presentan una localización menos excéntrica que en el tejido adiposo blanco. A nivel molecular, la grasa marrón se caracteriza por la expresión de la proteína desacoplante UCP-1 (Uncoupling Protein-1), que es activada por ácidos grasos de cadena larga, y permite la generación de calor mediante el desacoplamiento de la cadena respiratoria de la producción de ATP. La principal función del TAM es, por tanto, la termogénesis, esto es, la producción de calor y la homeostasis térmica (Rosen and Spiegelman, 2006). Durante años ha imperado la idea de que esta clase de grasa era exclusiva de los recién nacidos (Virtanen et al., 2009), sin embargo, diversos estudios recientes de visualización por tomografía de emisión de positrones han demostrado la presencia de grasa marrón en adultos, la cual se mantiene a lo largo de toda la vida, en proporciones que varían según la edad y con localización periescapular (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009).

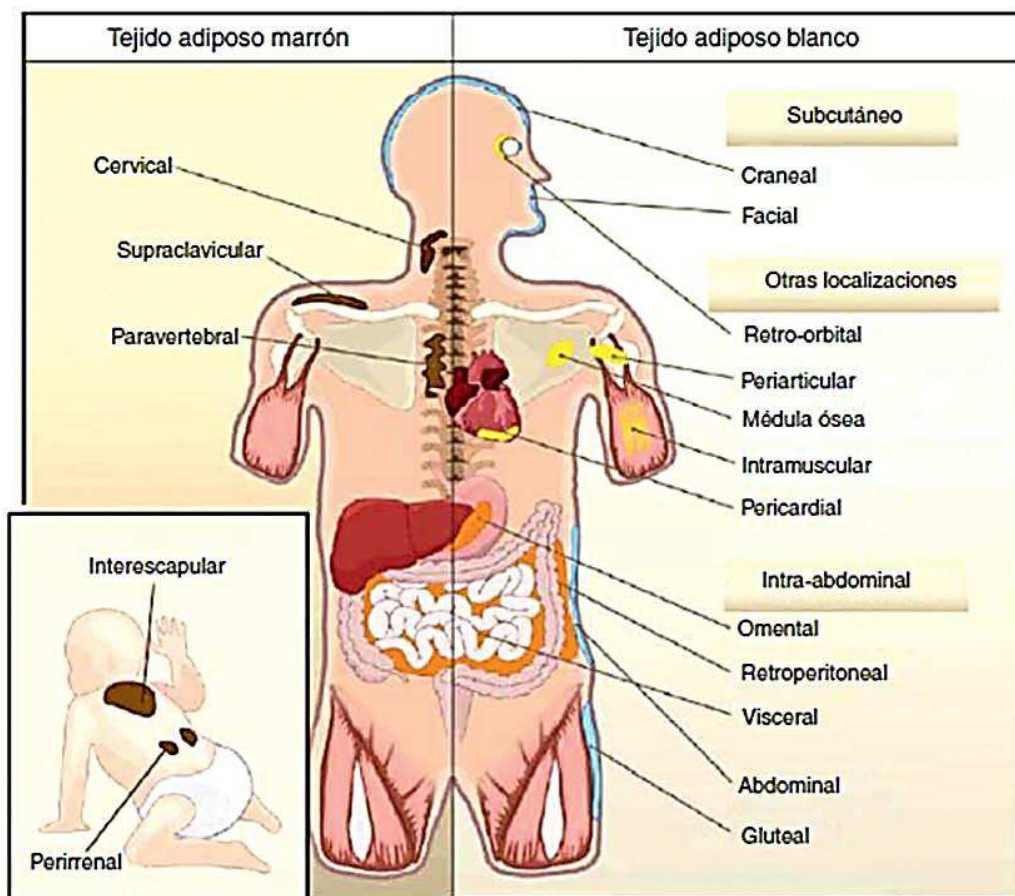


Figura 1: Distribución corporal del TAB y del TAM en humanos. Adaptado de Gesta S, Tseng Y-H, Kahn R. *Developmental origin of fat: Tracking obesity to its source*. Cell, 2007.

1.2 Tejido adiposo blanco

Este tejido constituye, en condiciones normales, el 15-20% del peso corporal de un hombre y el 20-25% de una mujer. Está compuesto principalmente por adipocitos y por una fracción estromal, que comprende macrófagos, células endoteliales, células madre pluripotentes y fibroblastos. Este estroma es responsable de la homeostasis del tejido (Trujillo and Scherer, 2006).

Los adipocitos que conforman el TAB son muy grandes (pueden alcanzar 100µm de diámetro) y el citoplasma está ocupado casi en su totalidad por una única vesícula de grasa que obliga al núcleo a disponerse en un extremo de la célula, muy cerca de la membrana citoplasmática. Los preadipocitos cuentan con múltiples vesículas pequeñas de grasa, que durante el proceso de maduración se fusionan para dar lugar a la gran vesícula unilocular.

En cuanto a las funciones de este subtipo de tejido graso, la principal es el almacenamiento de energía en forma de triglicéridos (TG). Por otro lado, tiene un papel estructural, actuando de soporte mecánico y protección de determinadas partes del organismo (Vigouroux et al., 2011). Como se

detalla en el siguiente apartado, la función endocrina del TA, estudiada a lo largo de las últimas dos décadas, concede a este complejo tejido una categoría que va mucho más allá de la de simple reservorio energético.

1.3 Tejido adiposo como órgano endocrino

Tradicionalmente, el tejido adiposo ha sido considerado exclusivamente un órgano de almacenamiento de energía durante la ingesta de alimentos y liberador de ácidos grasos durante el ayuno para suministrar combustible a otros tejidos. Sin embargo, el descubrimiento de la leptina en 1994 por el grupo de Friedman y colaboradores aportó una nueva perspectiva del tejido adiposo como órgano endocrino (Zhang et al., 1994), demostrándose su implicación en la regulación a nivel sistémico del balance energético, mediante la liberación al torrente sanguíneo de hormonas y otros productos específicos denominados adipocitoquinas o adipoquinas. Esas moléculas actúan como moduladoras del metabolismo llevando a cabo su función mediante señalización en órganos diana como el cerebro, páncreas, hígado, músculo, tracto reproductivo, sistema inmune y sistema vascular (Trujillo and Scherer, 2006). Las adipoquinas participan, por consiguiente, en procesos como la regulación de la ingesta y el gasto energético, la función del sistema inmune, la función vascular y la reproducción. Son además reguladoras de la acción de la insulina. A continuación se detallan las principales adipoquinas y su papel en el metabolismo.

1.3.1-Leptina

Es una hormona de 146 aminoácidos que se produce a partir de un precursor de 167 que pierde un péptido señal de 21 aminoácidos justo antes de pasar a la sangre. Es producida principalmente, aunque no de forma exclusiva, por el TA en proporción a la grasa corporal. La placenta, el músculo esquelético, los ovarios y el estómago han sido propuestos como sitios adicionales de síntesis (Akerman et al., 2002; Bado et al., 1998; Spicer and Francisco, 1997; Wolsk et al., 2007). Es una hormona que ejerce sus efectos sobre el comportamiento alimenticio, el apetito, la función cognitiva y el eje metabólico insulina-glucosa (Amitani et al., 2013). Su secreción está modulada por diversas hormonas; algunas aumentan su síntesis, como es el caso de la insulina, interleuquina-1, factor de necrosis tumoral-1 y glucocorticoides. Las que atenúan su expresión son la testosterona y las hormonas tiroideas (Sanchez-Munoz et al., 2005).

La leptina secretada por el TA a la sangre llega hasta el cerebro atravesando la barrera hemato-encefálica. Ejerce su función a nivel del sistema nervioso central uniéndose a sus receptores situados en el hipotálamo, concretamente en el núcleo arcuato (Elmqvist et al., 1999), donde inhibe a las neuronas de tipo NPY (*Neuropeptide Y*) y AgRP, impidiendo así que éstas liberen péptidos

orexigénicos (estimulantes del apetito) (Williams et al., 2011; Xu et al., 2011). Por otro lado, la leptina produce un incremento de la expresión de péptidos anorexigénicos en neuronas POMC/CART. La unión de la leptina a su receptor desencadena la activación de la quinasas intracelular JAK2 (*Janus Kinase 2*) vía transfosforilación, lo que da lugar a la fosforilación de STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) y su translocación al núcleo. JAK2 provoca, además, la fosforilación de IRS (*Insulin Receptor Substrate*), activándose así la vía de PI3K (*Phosphatidylinositol 3 kinase*)-Akt, favoreciéndose la expresión de los péptidos POMC e inhibiéndose los NPY/AgRP (St-Pierre and Tremblay, 2012; Wauman and Tavernier, 2011). La insulina también participa en la regulación de esta vía, ya que al unirse a su receptor, éste se autofosforila creando un sitio de unión para IRS, el cual activa a PI3K de forma no canónica (Figura 2), al igual que lo hace la leptina. La transducción de señales de la leptina y la insulina está, por tanto, interrelacionada y se entrecruza dando lugar a una compleja señalización que afecta a diferentes tejidos diana y a la regulación de la ingesta de alimentos mediante el control de la expresión de los neuropéptidos orexigénicos/anorexigénicos, así como a una sensibilización a la acción de la insulina. En lo que se refiere a la acción de una hormona sobre la otra, la leptina inhibe la síntesis y secreción de insulina por las células β -pancreáticas, las cuales también presentan receptores de leptina. De hecho, la leptina es capaz de bloquear la expresión del mRNA de la preproinsulina. Sin embargo, la insulina estimula la producción de leptina por el tejido adiposo (Amitani et al., 2013). Cuando este importante bucle de regulación no funciona correctamente se producen trastornos metabólicos que contribuyen al desarrollo de hiperinsulinemia y diabetes mellitus de tipo 2 (Galic et al., 2010).

El desarrollo de resistencia a la leptina juega un importante papel en patologías como la obesidad, por lo que este fenómeno ha sido estudiado activamente en las últimas décadas. Aunque de manera excepcional se han descrito mutaciones en el gen de la leptina y de sus receptores (Montague et al., 1997), el principal problema en la obesidad es que cursa con marcada resistencia a la leptina, por lo que los tratamientos consistentes en administración de leptina demostraron no obtener el éxito esperado (Munzberg et al., 2005). Existen 3 hipótesis sobre el mecanismo responsable de este fenómeno: (1) un fallo en el transporte de la leptina al cerebro a través de la barrera hematoencefálica, que impediría la unión a sus receptores; (2) una internalización de los receptores hipotalámicos de leptina debido al exceso de leptina circulante en sangre; y/o (3) inhibición de la señalización de determinados tipos de neuronas en zonas específicas del cerebro (Harris and Kletzien, 1994). Estudios de nuestro laboratorio también demostraron que una exposición prolongada a niveles muy altos de leptina, producida de forma ectópica por queratinocitos en ratones transgénicos no obesos, inducía resistencia a esta adipoquina (Rico et al., 2005).

1.3.2-Adiponectina

La adiponectina es una adipocitoquina sintetizada exclusivamente por el TA que pertenece a la superfamilia del colágeno. Es la adipoquina que se secreta en mayores cantidades (Scherer, 2006). Su producción es estimulada por la insulina, IGF-1 (*Insulin Growth Factor-1*), PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*) y LRH-1 (*Liver Receptor Homolog-1*) e inhibida por la leptina y la resistina, entre otros. Al contrario de lo que ocurría con la leptina, los niveles de adiponectina son altos en estados de ayuno y bajos en situación de exceso energético.

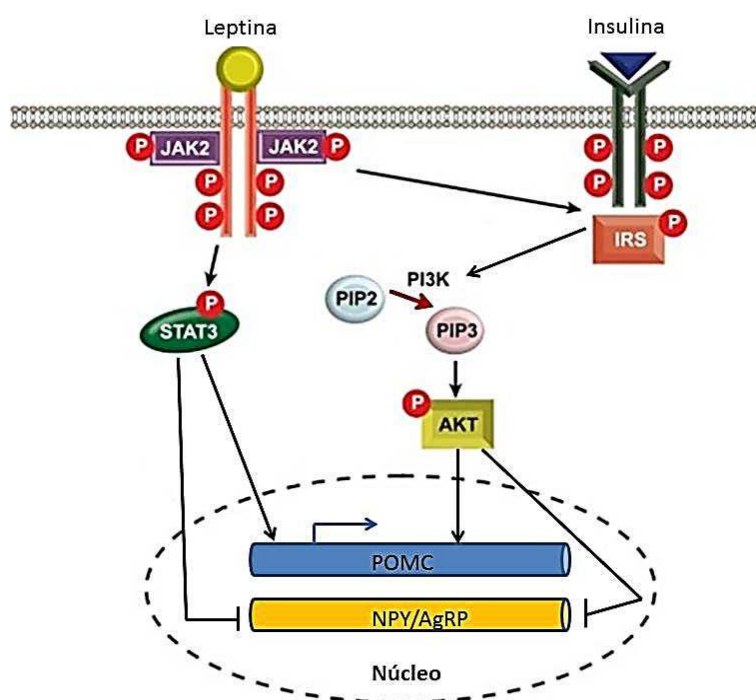


Figura 2: Señalización cruzada de la leptina y la insulina. La unión de la leptina a su receptor provoca la activación de la vía JAK/STAT. Además, produce la fosforilación de IRS, que activa PI3K; la cual promueve la activación de Akt. Esta segunda vía es también activada por la unión de la insulina a su receptor. Como resultado se activa la síntesis de péptidos anorexigénicos (POMC), mientras que se inhibe la de los orexigénicos (NPY/AgRP)

La adiponectina incrementa la insulinosensibilidad de tejidos metabólicos como el TAB, el músculo y el hígado. En el músculo se une al Receptor de Adiponectina 1 (AdipoR1), promoviendo la captación de glucosa por las células, mediante el estímulo de GLUT-4, y la oxidación de los ácidos grasos libres mediante la inhibición de la enzima Acetil-CoA carboxilasa. La cascada de señalización a partir de AdipoR1 no está muy bien caracterizada, pero se cree que en ella se produce la activación de la MAP quinasa p38 y PPAR γ (Kadowaki and Yamauchi, 2005). En el hígado, se une al Receptor de Adiponectina 2 (AdipoR2), y en él induce también la oxidación de ácidos grasos libres y modula la

gluconeogénesis mediante la regulación de sus dos principales enzimas: la Fosfoenol-piruvato-carboxi-quinasa y la Glucosa-6-fosfatasa (Reshef et al., 2003). La AMP quinasa, que es un sensor de los niveles de energía intracelular, es activada de forma fisiológica por la adiponectina (Cheng et al., 2014; Sanchez-Munoz et al., 2005). Además de sus funciones metabólicas, la adiponectina tiene efectos antiinflamatorios ya que inhibe NF-kb y reduce la secreción de un gran número de citoquinas liberadas por monocitos, macrófagos y células dendríticas (Matsuda and Shimomura, ; Scherer, 2006).

1.3.3-Resistina

La resistina es un miembro de la familia de proteínas ricas en cisteína denominadas RELMs (*Resistin-like molecules*). Es sintetizada por los adipocitos y, al igual que la leptina, se encuentra a bajas concentraciones en el ayuno y sus niveles aumentan con la ingesta. Los primeros estudios realizados en roedores revelaron que los niveles de esta adipoquina se encuentran elevados en situaciones de obesidad y resistencia a la insulina, pero disminuyen en presencia de sensibilizadores a la insulina como, por ejemplo, la rosiglitazona (Holcomb et al., 2000; Kim et al., 2001; Steppan et al., 2001). Además, la inmunoneutralización de la resistina conducía a un descenso de la hiperglucemia e incrementaba la insulinosensibilidad (Kusminski et al., 2005). Sin embargo, actualmente existe una gran controversia sobre el papel que juega esta adipoquina en la obesidad y el desarrollo de la insulinoresistencia en humanos, existiendo evidencias experimentales que proponen papeles contrapuestos para esta molécula (Maebuchi et al., 2003; Rajala et al., 2004). También se le ha atribuido a la resistina un papel en el proceso inflamatorio, como inductora de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (interleuquinas-1,-6 y -12), NF-kb y moléculas de adhesión (Karbowska et al., 2009; Silswal et al., 2005).

1.4 Adipogénesis: precursores, etapas y factores implicados

La adipogénesis es el proceso biológico por el que los preadipocitos diferencian a células adiposas maduras y se encuentra fuertemente regulado a nivel transcripcional y hormonal.

Los precursores celulares de los preadipocitos son las células madre mesenquimales (MSC). Se definen como células de tipo fibroblastoide y origen mesodérmico y tienen capacidad precursora, no solo del tejido adiposo, sino también del músculo, hueso, cartílago y tendón. Las MSC pueden ser aisladas de un amplio número de órganos y tejidos: médula ósea, tejido adiposo, páncreas, bazo, hígado, testículos, líquido amniótico, músculo esquelético, dermis, tejido óseo esponjoso, cordón umbilical y pulmón entre otros (Chen et al., 2008a).

La diferenciación de las MSC a un tipo celular concreto vendrá determinada por estímulos tejido-específicos así como por los factores de transcripción que se expresen en cada caso. En cuanto a la diferenciación adipogénica, las MCS dan lugar a dos tipos de precursores pre-adipocíticos: uno de ellos se caracteriza por expresar los factores de transcripción MYF5 y PAX7, y es común de los miocitos y pre-adipocitos marrones; el otro da lugar, mediante la expresión de determinados factores (PPAR γ , C/EBPs, aP2) al adipocito blanco (Figura 3). Esta diferenciación no es irreversible ya que se ha demostrado que, de darse las condiciones adecuadas (exposición continuada al frío o señalización β -adrenérgica), los adipocitos blancos pueden transdiferenciar a grasa marrón, gracias a la expresión de genes característicos de ese tipo celular (PGC1 α , SMAD3, PRDM16)(Cristancho and Lazar, 2011). La expresión temporal y ordenada de los factores de transcripción mencionados, junto a una serie de activadores, co-activadores, represores y co-represores, es así la responsable de dirigir y modular el proceso adipogénico mediante el control de la transcripción de genes cuya expresión es necesaria en este proceso. Seguidamente se detalla una relación de estos factores y sus principales características.

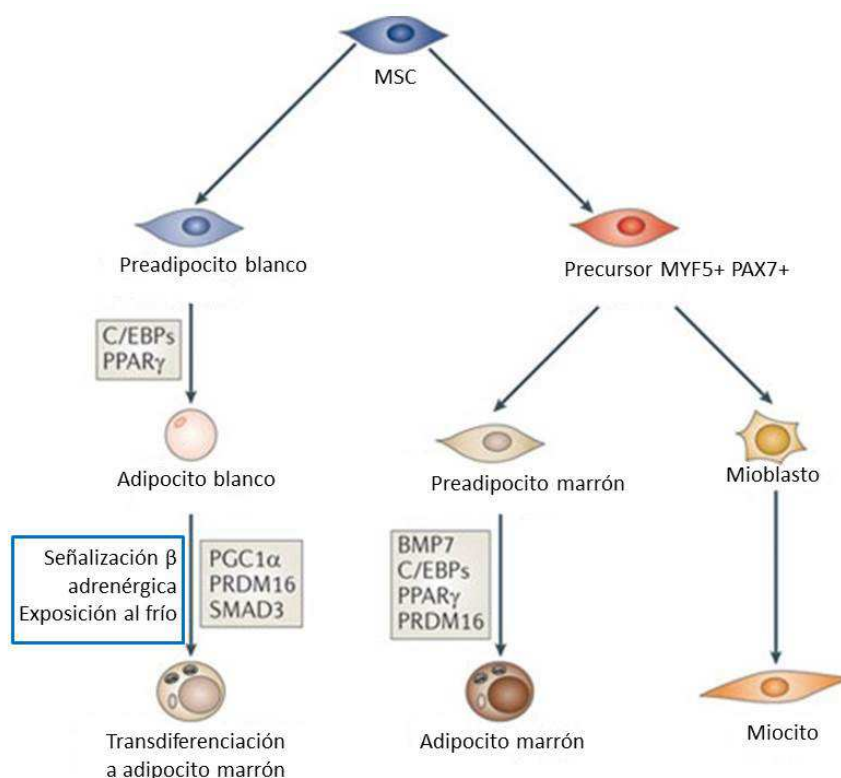


Figura 3: Células precursoras del adipocito blanco y marrón. Se indican los principales genes expresados en cada tipo celular. Modificado de Cristancho AG, Lazar A. *Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation*. Nature reviews, 2011.

1.4.1-PPAR γ

PPAR γ pertenece a la familia proteica de receptores de hormonas nucleares y es esencial para la diferenciación celular adipogénica y para la acumulación de lípidos durante la adipogénesis (Barak et al., 1999; Kubota et al., 1999; Rosen et al., 1999). Los receptores nucleares son una clase de proteínas intracelulares que, en respuesta a ligandos específicos, tienen la capacidad de unirse directamente al ADN para regular la expresión génica. En base a su mecanismo de acción, pueden clasificarse en receptores de tipo I, II, III o IV. PPAR γ pertenece al tipo II, que a diferencia de lo que sucede con los de tipo I, se mantiene en el núcleo independientemente de la unión a ligando.

La región C-terminal de PPAR γ es la responsable de la dimerización con el RXR (*Retinoid X Receptor*), necesaria para que se produzca su activación, y contiene, además, el principal dominio de activación transcripcional, llamado AF2 (*Activation Function 2*). Este dominio es una hélice anfipática muy importante para el acoplamiento de proteínas co-activadoras. La región N-terminal tiene función reguladora; y al igual que ocurre con la mayoría de los miembros de esta familia de proteínas, sus últimos 120 aminoácidos tienen actividad transcripcional. Además, ese dominio tiene un poder inhibitorio cuando es fosforilado por el miembro de la familia de las MAP quinasas Erk-1 ó 2 (Tontonoz and Spiegelman, 2008).

Existen dos isoformas de esta proteína: PPAR γ -1, que se expresa en la mayoría de los tejidos y PPAR γ -2, que contiene 30 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal (Kliwer et al., 1994; Tontonoz et al., 1994a; Zhu et al., 1995)(Figura 4). PPAR γ -2 se expresa mayoritariamente en el tejido adiposo y sus niveles aumentan considerablemente durante la adipogénesis (Tontonoz et al., 1994b; Wu et al., 1998). Existen evidencias experimentales que indican que ambas isoformas son fuertemente inducidas durante la diferenciación adipogénica (Rosen and MacDougald, 2006).

Al igual que la mayor parte de los receptores nucleares, PPAR γ es un factor de transcripción activado por ligando. La identificación de los ligandos biológicos de PPAR γ es un área de constante y activa investigación. Todo indica que durante la adipogénesis un activador endógeno de PPAR γ es sintetizado (Tzameli et al., 2004), pero aún no ha conseguido aislarse dicho compuesto. Sin embargo, existen moléculas candidatas a ser ligandos de este receptor. Así, numerosos estudios han demostrado la capacidad de los ácidos grasos poliinsaturados y otros compuestos derivados de ellos para activar PPAR γ y a otros miembros de la familia PPAR (Forman et al., 1997; Keller et al., 1993; Kliwer et al., 1997; Krey et al., 1997). Los ácidos grasos nativos activan muy débilmente a PPAR γ en comparación con PPAR α y PPAR δ , lo que apoya la hipótesis de que los ligandos naturales de PPAR γ puedan ser ácidos grasos modificados. Determinadas prostaglandinas, como la 15-deoxi-

$\Delta^{12,14}$ prostaglandina $_2$, son también activadoras de PPAR γ (Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1995). Sin embargo, dicha prostaglandina se encuentra a niveles muy bajos en el organismo como para poder constituir un ligando biológicamente significativo. Los ácidos grasos oxidados como, por ejemplo, 9-HODE o 13-HODE, también desencadenan una fuerte activación de PPAR γ y están presentes en niveles altos en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Nagy et al., 1998). Se plantea la posibilidad de que el ligando endógeno de PPAR γ sea diferente según el tejido. Otros lípidos potencialmente activadores de PPAR γ son los ácidos grasos nitrados y el ácido lisofosfatídico (Schopfer et al., 2005; Zhang et al., 2004a), aunque su función concreta en la señalización de PPAR γ no ha sido aún caracterizada.

A pesar de que los ligandos endógenos de PPAR γ no están todavía firmemente establecidos, existen moléculas sintéticas llamadas tiazolidinedionas (TZD) con potente actividad agonista de PPAR γ . Estos compuestos se emplean como fármacos antidiabéticos, ya que actúan incrementando la sensibilidad celular a la insulina y disminuyendo los niveles de glucosa y ácidos grasos libres en sangre. Las TZD se unen directamente a PPAR γ y aumentan la actividad transcripcional del heterodímero PPAR γ -RXR (Harris and Kletzien, 1994). En este grupo son de resaltar, por su importancia y potencia, la pioglitazona y la rosiglitazona.

PPAR γ constituye el factor de transcripción clave del proceso adipogénico, de tal manera que sin él no puede darse la formación de adipocitos maduros (Cristancho and Lazar, 2011). Es el responsable del desencadenamiento de la cadena de señalización que dirige la adipogénesis y el activador de gran parte de los genes implicados en este proceso. Su mecanismo de acción se encuentra detallado en el apartado 1.4.5.

Aunque los primeros estudios sobre PPAR γ se centraban únicamente en su función en el tejido adiposo, investigaciones posteriores revelaron su implicación en la regulación de la expresión génica de células mieloides. La expresión de PPAR γ se induce durante la diferenciación de monocitos a macrófagos (Ricote et al., 1998; Tontonoz et al., 1998) y a células dendríticas (Gosset et al., 2001; Szatmari et al., 2004), contribuyendo de esta forma a la modulación de la respuesta inmune e inflamatoria.

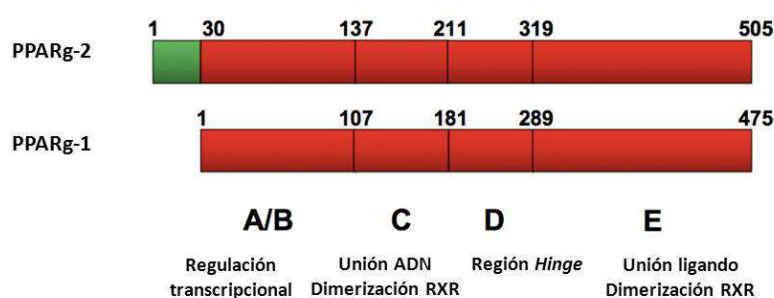


Figura 4: Estructura de PPAR γ -1 y PPAR γ -2. PPAR γ -2 presenta 30 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal. Ambas isoformas poseen cuatro dominios funcionales: A/B, C, D y E.

1.4.2-Familia de proteínas C/EBP

C/EBP (*CCAAT/Enhancer Binding Protein*) es una familia de seis factores de transcripción (α , β , γ , δ , ϵ y ζ) que contienen un dominio en su región C-terminal altamente conservado con estructura de cremallera de leucinas. Estos factores reconocen el motivo CCAAT de los promotores de los genes que modulan. Forman homo y heterodímeros con miembros de la misma familia o con otros factores de transcripción, ya que la dimerización es un requisito para que puedan unirse específicamente al ADN. Su principal sitio de expresión es el TA, donde tres de los miembros de esta familia participan en la regulación de la adipogénesis en sus primeras fases. C/EBP α es activado y a la vez activador de la expresión de PPAR γ e interviene en la diferenciación terminal del adipocito (Tang et al., 2004). C/EBP β y δ se expresan inmediatamente tras las primeras señales adipogénicas (Tang and Lane, 1999). La expresión ectópica de C/EBP β , pero no la de C/EBP δ , resulta ser suficiente para que se induzca la diferenciación de los adipocitos *in vitro* (Tang and Lane, 1999; Wu et al., 1996; Wu et al., 1995). C/EBP β es inducido por CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*) en respuesta a cambios en los niveles de AMP cíclico (AMPC) (Zhang et al., 2004b) y C/EBP δ es activado por los glucocorticoides (Cao et al., 1991). Sin embargo, hay aspectos sobre la diferente función de esas proteínas en el TAB respecto al TAM que aún se desconocen. Así, ha sido descrito que los ratones deficientes en C/EBP α pierden muchos de sus depósitos de TAB, mientras que su TAM no presenta ninguna alteración (Linhart et al., 2001). Por otra parte, los ratones deficientes en C/EBP β o δ poseen TAB idéntico al de los animales control, pero su TAM está claramente disminuido, así como la expresión de UCP-1 (Tanaka et al., 1997).

Al igual que sucedía con PPAR γ , estos factores no actúan exclusivamente en adipocitos, participando también en la regulación de las células mieloides: la expresión de C/EBP α es alta en los progenitores mieloides tempranos y disminuye a lo largo de la diferenciación granulocítica, mientras que los niveles de C/EBP β aumentan en la diferenciación de macrófagos (Natsuka et al., 1992; Scott et al., 1992). También existe expresión de esta familia de factores de transcripción en otros tipos celulares, como los hepatocitos, células del epitelio mamario, queratinocitos, células luteínicas del ovario, neuronas y células epiteliales del intestino (Cortes-Canteli et al., 2002; Chandrasekaran and Gordon, 1993; Lekstrom-Himes and Xanthopoulos, 1998; Robinson et al., 1998; Seagroves et al., 1998; Sterneck et al., 1997; Zhu et al., 1999).

1.4.3-aP2

aP2 (*adipocyte Protein 2*, también llamado FABP4) es una proteína transportadora de ácidos grasos que se expresa en adipocitos y macrófagos. (Baxa et al., 1989). Su expresión se induce durante la adipogénesis por lo que es usado frecuentemente como un marcador adipogénico (Bernlohr et al., 1985). PPAR γ y sus agonistas incrementan su expresión, así como los miembros de la familia C/EBP, que tienen un sitio de unión en el promotor de este gen (Cabre et al., 2007; Christy et al., 1989). Los niveles de esta proteína son mayores en la grasa subcutánea que en la visceral y su misión es facilitar el paso de los ácidos grasos y otras moléculas lipofílicas, como eicosanoides y retinoides, a través de las membranas extra e intracelulares (Chmurzynska, 2006; Smathers and Petersen, 2011; Weisiger, 2002). Varios estudios la relacionan con el desarrollo de la resistencia a la insulina y la hipertrigliceridemia y, además, se ha descrito que su silenciamiento conduce a un incremento en la secreción de insulina inducida por glucosa y una disminución de la inducida por la lipólisis (Baar et al., 2005; Cao et al., 2006; Scheja et al., 1999; Uysal et al., 2000).

1.4.4-Otros factores

Otros factores de transcripción que regulan la adipogénesis son los **KLF** (*Krüppel Like Factors*) y pertenecen a la familia de proteínas con dedos de zinc de tipo C2H2. KLF2 se une al promotor de PPAR γ -2 reprimiendo su activación transcripcional, inhibiendo de esa forma la adipogénesis (Rosen and MacDougald, 2006). Pero al inducirse el proceso adipogénico, C/EBP β provoca la expresión de otra proteína de esta familia, KLF5, la cual desplaza a KLF2 del promotor de PPAR γ -2, permitiendo así la expresión de este último. En la diferenciación terminal, disminuyen los niveles de KLF5 pero aumentan los de KLF15, que también interacciona con PPAR γ favoreciendo su expresión, junto con la de otros genes propios de adipocitos maduros como GLUT4 (Oishi et al., 2005). También KLF4 colabora en este proceso promoviendo la expresión de C/EBP β (Birsoy et al., 2008; Chen et al., 2005).

1.4.5-Mecanismo molecular de la adipogénesis

PPAR γ es el principal regulador de la adipogénesis. Su expresión es absolutamente necesaria para que se dé este proceso de diferenciación, en el que dirige una cascada de activación transcripcional que involucra a los factores anteriormente detallados. Gracias a rigurosos estudios celulares (Rosen and MacDougald, 2006; Rosen and Spiegelman, 2006), se ha podido establecer un modelo del

mecanismo de la adipogénesis en el que los estímulos pro-adipogénicos inducirían la expresión de C/EBP β y C/EBP δ . A continuación, esas proteínas se unirían directamente al promotor de PPAR γ (Wu et al., 1996; Wu et al., 1995) activando su expresión. Por su parte, PPAR γ estimularía la expresión de genes implicados en la adipogénesis y la lipogénesis como son: aP2, CD36, LPL, PEPCK, Aquaporina 7, GLUT4, PGAR, GlyK o Perilipina. Esta activación de PPAR γ produce, adicionalmente, la activación de C/EBP α . A su vez, C/EBP α es capaz de unirse a un sitio en el promotor de PPAR γ generando así un bucle estable de retroactivación (Figura 5b). PPAR γ es suficiente y necesario para que se dé la diferenciación adipogénica: en ausencia de C/EBP α , la expresión de PPAR γ es suficiente para que se produzca correctamente la diferenciación, pero, en ausencia de PPAR γ , C/EBP α no es capaz de desencadenar este proceso (Rajala et al., 2004). Sin embargo, las células sin expresión de C/EBP α presentan menor sensibilidad a la insulina, lo que indica que ese factor es necesario para que el programa adipogénico se desarrolle por completo. Aunque el proceso de señalización de PPAR γ se ha estudiado de forma más extensa en el TAB, su expresión se induce también en el TAM embrionario y adulto, y es muy importante para su desarrollo y función (Sears et al., 1996). PPAR γ induce la diferenciación terminal de los preadipocitos marrones y estimula la expresión de la proteína UCP-1. Es interesante resaltar que en este tejido la regulación de UCP-1 por PPAR γ requiere de PGC-1 α , gen expresado selectivamente en el TAM frente al TAB (Puigserver et al., 1998).

1.5 Sistemas modelo de adipogénesis *in-vitro*

La adipogénesis es un proceso fisiológico que ha sido reproducido *in-vitro* en diversos estudios con el objetivo de profundizar en el conocimiento de sus bases moleculares y celulares. A finales de la década de los 70 se describió por primera vez la diferenciación adipogénica químicamente inducida de la línea celular de preadipocitos murinos 3T3-L1 (Mackall et al., 1976). Tras 1 ó 2 semanas en confluencia estas células presentaban la capacidad de adquirir la morfología característica de los adipocitos. Esto iba acompañado de un incremento en la síntesis y acumulación de grasa citoplasmática. A día 3, después de alcanzar la confluencia, ya se detectaban las primeras deposiciones de TG y entre los días 7 y 14 ya podía observarse tinción de la grasa al utilizar el colorante lipofílico *Oil-Red-O* (ORO). También fueron medidos los niveles de proteína total, que aumentan al doble de los iniciales, y el tamaño celular, que sufre un incremento significativo debido a la acumulación intracelular de TG.

El proceso de diferenciación por el que los preadipocitos maduran *in-vitro* a adipocitos consta de varias etapas: en primer lugar debe alcanzarse la confluencia celular, lo que produce una parada del ciclo de las células en cultivo inducida por la inhibición por contacto (Green and Meuth, 1974; Kuri-Harcuch and Green, 1978). El hecho de estar cada una de las células en contacto con otras, es en sí

mismo una señal para dirigir la diferenciación de los preadipocitos y MSC hacia adipocitos, mientras que al contrario, la baja confluencia, favorece la diferenciación hacia osteocitos (Grigoriadis et al., 1988).

La aparición de los estímulos pro-adipogénicos (que *in vitro* es debida a los componentes específicos añadidos al medio de cultivo) conduce a la re-entrada de las células de forma sincronizada al ciclo celular. De esta manera, experimentan 2 rondas adicionales de mitosis en un proceso conocido como expansión mitótica clonal (Rosen et al., 2000). En esta etapa de diferenciación temprana se induce la expresión de C/EBP β y δ (Cao et al., 1991) y, posteriormente, la de PPAR γ y C/EBP α . En la diferenciación terminal se mantiene la expresión de PPAR γ y C/EBP α y se activa la del conjunto de genes que intervienen en el programa adipogénico celular. Esto va acompañado de la acumulación de grasa en el interior celular y un cambio de morfología hacia una conformación más globular (Lefterova et al., 2008)(Figura 5).

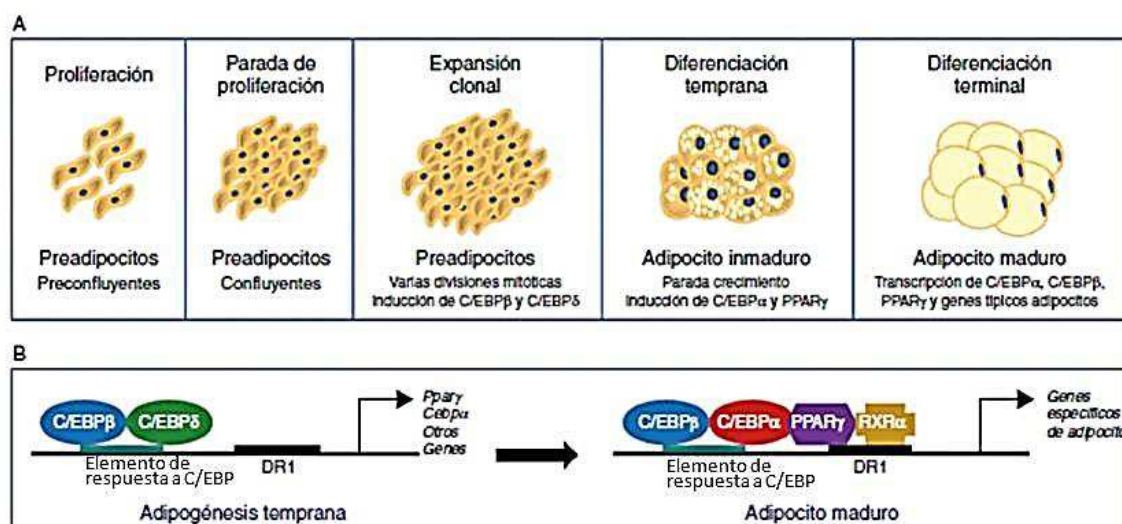


Figura 5: Diferenciación de preadipocitos a adipocitos. A) Esquema de la transición de preadipocito a adipocito maduro *in-vitro* indicándose los diferentes estadios. B) Modelo secuencial del control transcripcional durante la adipogénesis. Adaptado de Esteve Rafols M. *Tejido Adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional*. Endocrinología y Nutrición, 2013.

La adipogénesis humana también puede recapitularse *in vitro* a partir de MSC o preadipocitos aislados añadiendo al medio de cultivo un cóctel de factores adipogénicos exógenos.

En los últimos años se ha hecho un gran esfuerzo en identificar nuevos tejidos de los que sea posible el aislamiento de MSC, por su potencial uso terapéutico en reparación tisular. De esta forma, existen evidencias de la existencia de una pequeña subpoblación celular entre los fibroblastos dérmicos con características y propiedades similares a las MSC (Sorrell et al., 2007). Wagner y cols. analizaron esta población y, aunque presentaba una expresión de marcadores semejante a las MSC, carecía de potencial adipogénico (Wagner et al., 2005). Estas células presentaban una expresión muy débil del

marcador CD105, mientras que las MSC precursoras de los adipocitos expresan niveles altos de CD105. En otros estudios (Lysy et al., 2007) se identificó esa población de células CD105+, pero en este caso sí tenían capacidad de diferenciar a adipocitos, aunque solo cuando se trataba de células jóvenes (con menos de 3 pases). Por su parte, Bader y cols. describieron detalladamente diferentes características de esta subpoblación celular (Lorenz et al., 2008) y asignaron un perfil concreto de marcadores de superficie a esos precursores. Además, tenía capacidad de diferenciar a los linajes adipogénico y osteogénico en presencia de los medios de cultivo adecuados, usando células con pase inferior a 6. Más recientemente, se han aislado diferentes subpoblaciones de células dérmicas en función de los marcadores de MSC que expresan y se ha descrito la capacidad de diferenciación de cada una de ellas (Vaculik et al., 2011), observándose que algunos de estos marcadores se expresan siempre conjuntamente. Estos datos también sugieren que el procedimiento de aislamiento y las condiciones de cultivo afectan de forma muy importante al potencial de diferenciación de las poblaciones precursoras minoritarias obtenidas. A pesar de las discrepancias en cuanto a la heterogeneidad morfológica y funcional presente en la población de fibroblastos dérmicos (Goldring et al., 1990; Sorrell et al., 2007, 2008); es evidente que la subpoblación con potencial de diferenciación adipogénico constituye un pequeñísimo porcentaje del total de células dérmicas presentes en la piel.

2. ENFERMEDADES DEL TEJIDO ADIPOSO

Existen diversas enfermedades que afectan al tejido adiposo, las cuales se clasifican en los siguientes grupos:

2.1 Lipomas

Los lipomas son tumores benignos del tejido adiposo que pueden desarrollarse en todas las regiones grasas del organismo aunque se dan con más frecuencia en el TA subcutáneo. Desde el punto de vista macroscópico, los lipomas son masas de TA bien delimitadas, rodeadas de una fina cápsula fibrosa. Microscópicamente, se organizan en grupos de adipocitos maduros, univacuolados, con núcleos excéntricos y separados por finos tabiques de tejido conjuntivo (Inampudi et al., 2004; Pedeutour and Foa, 2002). Del 20 al 50% de los lipomas no presentan anomalías cromosómicas. Los demás presentan defectos genéticos que implican, en su mayoría, al gen HMGIC (*High Mobility Group Isoform C*) (Pedeutour and Foa, 2002). En cuanto a su tratamiento, se realiza su exéresis quirúrgica bajo anestesia local, aunque también se pueden eliminar por liposucción.

2.2 Lipomatosis

Es una enfermedad que se caracteriza por la presencia de múltiples lipomas distribuidos por todo el cuerpo, especialmente en el tronco y las extremidades (Keskin et al., 2002). Existen lipomatosis hereditarias, que son consideradas enfermedades raras de transmisión autosómica dominante, en las que los pacientes no sufren alteración del metabolismo lipídico y presentan lipomas encapsulados (Toy, 2003); y adquiridas, en las que las masas adiposas no están encapsuladas y son de etiología desconocida. Hay un tercer grupo de esta enfermedad, las lipomatosis iatrogénicas, que aparecen en pacientes tratados con quimioterapia, radioterapia o corticoides (Cronin et al., 2010).

2.3 Lipodistrofias

Bajo el término de lipodistrofia (LD) se engloban una amplia variedad de trastornos genéticos y adquiridos, todos ellos caracterizados por una pérdida selectiva de la grasa corporal, aunque la proporción de grasa varía mucho de unos casos a otros. La pérdida de tejido adiposo en cantidades importantes se asocia con el desarrollo de resistencia a la insulina y las complicaciones que de ello se derivan: diabetes, dislipidemia, esteatosis hepática, acantosis nigricans, ovario poliquístico e hipertensión (Garg, 2000, 2004). Hasta que no fue descrito el mecanismo de señalización de la insulina no se comprendía el porqué de esta asociación.

Los tres grandes tipos de LD son los siguientes:

- Lipodistrofia Congénita Generalizada (LCG) o síndrome de Berardinelli-Seip, que se caracteriza por una ausencia total de la grasa corporal y se observa desde el nacimiento del niño.
- Lipodistrofia Familiar Parcial (LFP), en la cual la pérdida de grasa se da solo en zonas concretas y aparece más tarde, durante la infancia o la pubertad. Estas variedades de LD, a diferencia de las LCGs, suelen ir acompañadas de retraso mental y cardiomiopatías (Agarwal et al., 2003; Magre et al., 2001; Seip and Trygstad, 1996).
- Por último, existen formas adquiridas (no genéticas) de LD, aunque son muy poco frecuentes. Dentro de éstas, destaca la asociada a la terapia anti-retroviral en pacientes de VIH. La sufren un 40% de estos pacientes y se caracteriza por una pérdida severa de la grasa subcutánea, acumulación de grasa visceral y acumulaciones de grasa exageradas en la espalda, a modo de joroba (Caron-Debarle et al., 2010).

La LCG es una enfermedad altamente infrecuente y de complejo diagnóstico, por lo que es difícil establecer una frecuencia exacta de personas afectadas. Este trabajo se centra en el estudio de la LCG, cuya prevalencia estimada es de 1:10.000.000 (Garg, 2004).

2.3.1-Lipoatrofias

El término lipoatrofia define la pérdida de tejido adiposo subcutáneo secundario a un proceso inflamatorio de la hipodermis. La diferencia con las lipodistrofias es que en estas últimas no hay proceso inflamatorio previo (Keskin et al., 2002).

3. LIPODISTROFIA CONGÉNITA GENERALIZADA

3.1 Características

La LCG es una enfermedad autosómica recesiva en la que desde el nacimiento se puede reconocer la ausencia total de grasa y un aspecto demasiado musculado en los recién nacidos que se debe a un excesivo desarrollo muscular. Los niños crecen muy rápido y desarrollan un apetito desmesurado. Presentan rasgos acromegálicos en manos, pies y mandíbula y también hepatomegalia; además de acantosis nigricans, que se manifiesta como parches oscuros de piel engrosada y aterciopelada en áreas como el cuello, las rodillas o las axilas. En el caso de las mujeres hay complicaciones adicionales como el hirsutismo, oligomenorrea y ovario poliquístico (Agarwal et al., 2003; Seip and Trygstad, 1996; Van Maldergem et al., 2002). Al no disponer de tejido adiposo, la grasa ingerida por estos pacientes con la dieta permanece en el torrente sanguíneo generando hipertrigliceridemia y puede depositarse en órganos como el corazón o el hígado, donde provoca esteatosis hepática y/o cirrosis. La persistencia de triglicéridos en sangre puede contribuir también al desarrollo de aterosclerosis. La LD se caracteriza también por los bajos niveles plasmáticos de leptina y adiponectina (Haque et al., 2002), los cuales son debidos a la ausencia de TA, que es el órgano responsable de la síntesis y secreción de estas adipoquinas. Esto conduce al desarrollo de una marcada resistencia a la insulina, diabetes de tipo II y problemas metabólicos asociados.

3.2 Genes implicados en la LCG

Existen varios tipos de LCG, con algunas características clínicas diferenciales que dependen del gen alterado: tipo 1 (gen AGPAT2 o BSCL1), tipo 2 (gen BSCL2), tipo 3 (gen CAV1) y tipo 4 (gen PTRF1). A continuación se detallan las características más importantes de los dos primeros, que son los que están implicados en más del 50% de las LCGs.

- AGPAT2:

Las 1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasas (AGPATs) son enzimas que catalizan la esterificación de un ácido graso al ácido lisofosfatídico para generar ácido fosfatídico, que es esencial tanto para la síntesis de los triglicéridos como para la de los fosfolípidos (Agarwal et al., 2004). Existen 11 isoformas de AGPAT, siendo la 2 específica de los adipocitos y la 1 de expresión ubicua. Todas se localizan en el retículo endoplásmico, lugar en el que se inicia la formación de las vesículas lipídicas (Chen et al., 2008b; Leung, 2001).

AGPAT2 juega un papel importante en la adipogénesis, entendida ésta no sólo como la síntesis de triglicéridos sino como todos los eventos moleculares y celulares que culminan en la formación de grasa, de manera que si su actividad está disminuida o es nula, la adipogénesis se ve gravemente afectada. En primer lugar, al no funcionar correctamente esta enzima, se acumula el sustrato de la reacción, el ácido lisofosfatídico, el cual participa en la proliferación de los preadipocitos, de manera que ésta no se desarrolla correctamente (Hla et al., 2001; Pages et al., 2001). Por otra parte, disminuyen las concentraciones y, por tanto, la biodisponibilidad del ácido fosfatídico en la célula, que juega un papel crucial en algunas vías de señalización celular (Fang et al., 2001). Adicionalmente, al no haber actividad AGPAT2, se inhibe tanto la síntesis como el almacenaje de los triglicéridos, lo que genera adipocitos afuncionales sin grasa en su interior y un aumento de la concentración de los triglicéridos en sangre respectivamente (Agarwal et al., 2004).

Evidencias recientes entre las que se encuentran los hallazgos de este trabajo de tesis doctoral sugieren que, además de su papel en la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos, AGPAT2 podría ser un regulador directo de la adipogénesis por mecanismos aún no bien caracterizados.

- BSCL2:

El gen BSCL2 (*Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy 2*) codifica para la seipina, una proteína de 398 aminoácidos que se encuentra en la membrana del retículo endoplásmico (Agarwal and Garg, 2004; Lundin et al., 2006; Windpassinger et al., 2004). Se desconoce su función exacta, aunque existen evidencias experimentales que indican que podría ser la responsable de la fusión de las pequeñas gotas de grasa que dan lugar a las vesículas de mayor tamaño que contienen los adipocitos (Garg and Agarwal, 2009), entre otras posibles funciones. Este gen se expresa mayoritariamente en el tejido adiposo, el cerebro y los testículos (Magre et al., 2001; Payne et al., 2008).

3.3. Implicación de los genes causantes de lipodistrofia en el mecanismo de la adipogénesis

Muchos de los genes mencionados anteriormente (AGPAT2, BSCL2, CAV1) juegan, a distintos niveles, un papel crucial en la producción de las gotas lipídicas que dan lugar, por fusión, a la vesícula que ocupa gran parte del citoplasma del adipocito blanco. La estructura de estas vesículas lipídicas consiste en un núcleo central de lípidos hidrofóbicos neutros, como ésteres de colesterol y triglicéridos, rodeados de una envuelta anfipática de fosfolípidos, especialmente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, y proteínas. Desde el punto de vista funcional, las vesículas lipídicas han sido siempre consideradas como partículas estáticas de grasa, sin embargo, estudios recientes han podido demostrar que son orgánulos dinámicos, con una compleja regulación (Thompson et al., 2010). Estas gotas son características de los adipocitos, pero se encuentran también en otros tipos celulares, proporcionándoles la capacidad de almacenar energía en un espacio hidrofóbico, evitándose así la toxicidad lipídica. La formación de la vesícula se inicia en el retículo endoplásmico, que es el lugar donde se localiza la enzima agpat2, que permitirá la síntesis de los triglicéridos que formarán el centro de la gota (Figura 6). Bsc12 o seipina se sitúa en la membrana endoplasmática, y se ha sugerido como un homo-oligómero de simetría radial que podría favorecer la fusión de las vesículas pequeñas, organizándolas previamente a su alrededor a modo de collar. Al igual que Bsc12, también se encuentran en la membrana del retículo endoplásmico las proteínas perilipina1 y CIDEC, que se encargan del almacenaje e hidrólisis de los triglicéridos, y de la regulación del tamaño de la gota respectivamente (Binns et al., 2010). Simultáneamente, a nivel de la superficie celular, se forman caveolas por invaginación de la membrana plasmática, formadas por colesterol, glucoesfingolípidos y la enzima caveolina 1 (codificada por el gen CAV1). Las caveolas se fusionan con las gotas de grasa, quedando éstas en su interior. Caveolina 1 está implicada en la diferenciación adipogénica y en el transporte de lípidos, y se trasloca de la superficie de la caveola al interior de la vesícula lipídica en respuesta a un incremento de los ácidos grasos libres. La proteína PTRF, también conocida como Cavina, regula la expresión de Caveolina 1. Según lo descrito por Fujimoto y Ohsaki (Fujimoto and Ohsaki, 2006), la formación de las vesículas es dependiente de la estructura de los ácidos grasos: los ácidos grasos insaturados, pero no los saturados, promoverían la síntesis de nuevas gotas lipídicas y/o el aumento de tamaño de las ya existentes. Los niveles altos de ácidos grasos saturados, como el palmitato, producen estrés oxidativo en los preadipocitos activándose la apoptosis (Guo et al., 2007). Si alguna de estas enzimas, implicadas en la síntesis de las vesículas de grasa que forman el adipocito maduro, no funciona correctamente se produce una alteración en la adipogénesis que puede dar lugar, en última instancia, al desarrollo de LCG.

3.4 Tratamiento de la lipodistrofia

Debido a la gran heterogeneidad que caracteriza a la LD, cada caso requiere un seguimiento individual y la eficacia de un mismo tratamiento puede variar mucho según el tipo de LD y las características particulares del paciente. El tratamiento va dirigido a paliar los trastornos metabólicos que acompañan a esta enfermedad, aunque no existe una terapia que consiga corregirla por completo.

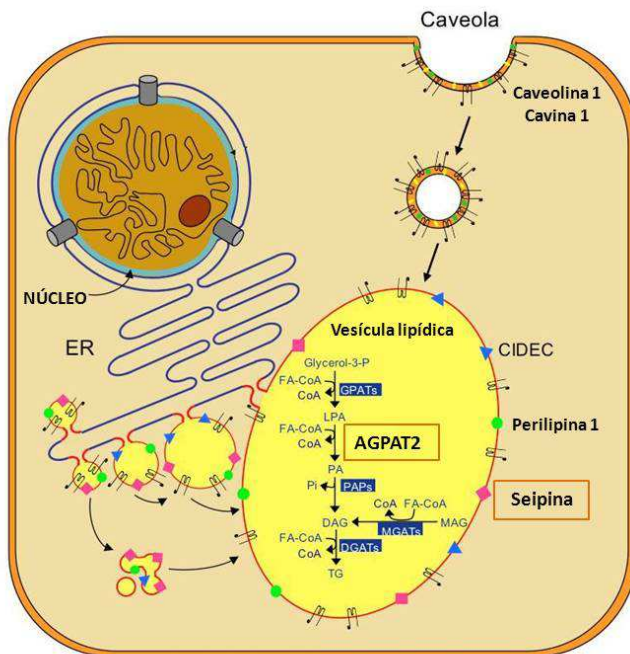


Figura 6: Formación de vesículas lipídicas en el adipocito y localización celular de las diferentes proteínas que participan en este proceso. Se detallan las reacciones que conducen a la formación de triglicéridos, en las que AGPAT2 juega un papel esencial. ER: Retículo Endoplasmático. Modificado de Garg A. *Lipodystrophies: Genetic and acquired body fat disorders*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2011.

Tradicionalmente, la principal pauta para los pacientes con LD ha sido un estricto control de la dieta, de manera que ésta no tenga un alto contenido en grasa para evitar que se mantenga circulando en sangre y se deposite en arterias, hígado u otros órganos. Se recomienda que menos de un 30% de las calorías diarias provengan de las grasas (Krauss et al., 2000). Otro aspecto importante es la realización de ejercicio físico aeróbico y de resistencia, que produce el incremento de los niveles de las lipoproteínas de alta densidad HDL (Jones et al., 2001), además de hacer más efectiva la terapia farmacológica (Driscoll et al., 2004). La terapia con fármacos va dirigida fundamentalmente a controlar la diabetes de estos pacientes, y para ello se usa comúnmente Metformina, un compuesto que aumenta la sensibilidad a la insulina y con pocos efectos secundarios. Asimismo, fármacos de la familia de las TZDs, como la Pioglitazona o la Rosiglitazona, también son usados para tratar la diabetes. Su mecanismo de acción consiste en unirse y activar a PPAR γ , para promover la activación de la adipogénesis (Anghel et al., 2007). Tanto la Pioglitazona como la Rosiglitazona disminuyen la resistencia a la insulina y consiguen disminuir la concentración de glucosa en sangre (Ludtke et al., 2005; Schindler et al., 2009). El problema de las TZDs es que tienen efectos adversos, pudiendo

generar hepatotoxicidad, pérdida de tejido óseo, problemas cardiovasculares y edema (Lago et al., 2007; Nissen and Wolski, 2007; Yaturu et al., 2007), por lo que su uso se ha restringido mucho en los últimos años. En cuanto al tratamiento para la dislipidemia derivada de la LD, se usan fármacos que son agonistas de PPAR α , llamados fibratos. En algunos pacientes lipodistróficos, las estatinas a bajas dosis pueden ayudar a reducir los niveles de colesterol no-HDL, previniéndose el desarrollo de aterosclerosis Web de la Sociedad Española de Lipodistrofias (<https://sites.google.com/site/lipodystrophy/home>).

3.4.1 Tratamiento de las LD con leptina

Como se comentó en el apartado 3.1, la ausencia de grasa corporal en los pacientes con LCG tiene como consecuencia la falta de leptina. En 1999, se demostró en un modelo de LD en ratón que la leptina revertía el síndrome metabólico en estos animales (Shimomura et al., 1999). A partir de estos estudios se desarrollaron protocolos destinados a pacientes con LCG, que se encuentran aún en fase de ensayo clínico, y que consisten en el suministro diario de leptina recombinante humana (metreleptina) por vía subcutánea. Actualmente, este tratamiento está financiado por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos de América. En España, el centro de referencia para la dispensación de la leptina recombinante humana es el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. La administración subcutánea de leptina tiene efectos beneficiosos en los pacientes con LD, ya que aumenta la sensibilidad a la insulina, la tolerancia a la glucosa y disminuye

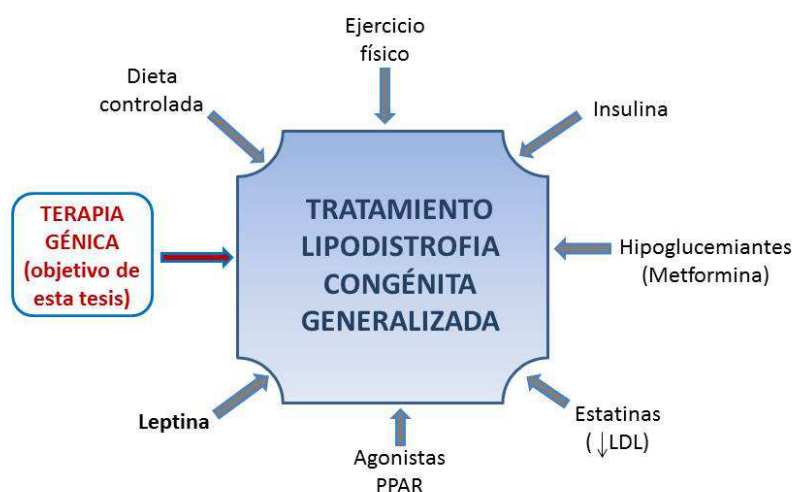


Figura 7: Esquema que ilustra las opciones que existen en la actualidad para el tratamiento de la LCG.

la hipertrigliceridemia, haciendo menos necesario el uso de la insulina y los hipoglucemiantes orales (Beltrand et al., 2007). Por otro lado, la leptina reduce también la proteinuria y normaliza las

anomalías menstruales, los niveles de estradiol y de hormona luteinizante en mujeres con ovario poliquístico (Musso et al., 2005; Oral et al., 2002). En muy raros casos se han observado efectos secundarios en este tratamiento, que consisten en el desarrollo de resistencia a la leptina, nefropatía diabética y linfomas de células T (Oral and Chan, 2010; Savage and O'Rahilly, 2010).

3.4.2 Terapia génica

Al tratarse de una enfermedad de origen genético, se pueden contemplar otras estrategias, como la terapia génica, para la corrección de la LCG. Ésta técnica experimental va dirigida a modificar la dotación genética de las células de un organismo mediante la introducción de un gen que sustituirá a otro que es defectuoso en su función, revirtiendo así el trastorno biológico que esto provoca. Según la estrategia empleada, la terapia génica puede clasificarse en:

- Terapia génica *in vivo*: aquella en la que el material genético se introduce directamente en las células del organismo, sin extraerlas ni manipularlas previamente *in vitro*.
- Terapia génica *ex vivo*: comprende aquellos protocolos en los que las células a tratar deben ser extraídas del paciente, aisladas, crecidas en cultivo y sometidas al proceso de transferencia *in vitro*. Tras la selección de las células que han sido corregidas, éstas han de ser amplificadas e introducidas de nuevo al paciente (Novelli and Gruenert, 2002).

Entre los métodos de transferencia génica más utilizados y eficaces se encuentran los vectores retrovirales y lentivirales. Estos vectores tienen la ventaja, respecto a otros, de permitir la expresión permanente del gen terapéutico por integrarse de forma estable en el genoma celular. Tanto en los vectores retrovirales como en los lentivirales, los genes codificantes del virus se sustituyen por el transgén de elección y los genes de empaquetamiento del vector son aportados en trans, lo que los convierte en sistemas bioseguros, ya que no pueden generar partículas víricas por sí mismos. Una descripción más detallada de los aspectos relacionados con los vectores de transferencia génica queda fuera del alcance de esta tesis.

En 2001, nuestro laboratorio abordó de forma experimental la reposición de leptina en ratones ob/ob (Larcher et al., 2001) como modelo de hipoleptinemia. Esto se llevó a cabo mediante el trasplante de equivalentes cutáneos portadores de queratinocitos transgénicos, capaces de sintetizar leptina y corregir así el trastorno metabólico que sufrían esos animales. En esta tesis doctoral nos planteamos la generación de grasa funcional productora de leptina, partiendo de fibroblastos dérmicos de pacientes con LCG, para poder solucionar, entre otros problemas, el déficit de esa adipocina que caracteriza a esta enfermedad. En nuestro abordaje, basado en terapia génica retroviral, conseguimos la diferenciación funcional a adipocitos de células dérmicas de

pacientes lipodistróficos mediante la expresión de un gen que no es el que aparece mutado en la LCG, pero cuya expresión resulta suficiente para lograr la generación de tejido adiposo funcional del que carecen estos pacientes.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es desarrollar un protocolo de terapia génica y celular que pueda ser aplicado en el tratamiento de la Lipodistrofia Congénita Generalizada y que permita la reposición de las adipoquinas sintetizadas fisiológicamente por el tejido adiposo.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer una metodología experimental eficaz y reproducible que permita la reprogramación y diferenciación adipogénica de fibroblastos dérmicos humanos.
2. Analizar el potencial adipogénico de los fibroblastos de paciente de LCG al ser modificados genéticamente.
3. Realizar una caracterización funcional de los adipocitos generados a partir de células de donantes sanos y de paciente de LCG y determinar su capacidad para experimentar una diferenciación terminal.
4. Estudiar el perfil lipidómico de los adipocitos obtenidos mediante reprogramación y diferenciación inducida
5. Evaluar la estabilidad (o persistencia) y posible toxicidad de las células modificadas genéticamente formando parte de sistemas organotípicos trasplantadas en un modelo murino.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

Todos los cultivos celulares que se describen a continuación se mantuvieron a 37°C en una atmósfera saturada de humedad compuesta por un 95% de aire y un 5% de CO₂ (incubador de CO₂, NAPCO, Thermo Scientific). El medio de cultivo fue reemplazado cada dos o tres días en función de la actividad metabólica celular.

Para proceder al subcultivo celular, la capa de células se lavó con PBS y las células se liberaron de la superficie de crecimiento por tripsinización con una disolución de tripsina/EDTA (0,25 % en PBS, Sigma).

Para su preservación, las células se congelaron en nitrógeno líquido. Para ello, cultivos en fase exponencial de crecimiento se tripsinizaron y se resuspendieron en suero fetal bovino (BioWhittaker) al que se le añade dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) al 10% (v/v) como agente criopreservante.

Todo el trabajo experimental llevado a cabo con células se realizó en condiciones estériles, en cabina de flujo laminar de bioseguridad de nivel II.

1.1 Cultivo de fibroblastos humanos

Los fibroblastos humanos fueron obtenidos, previa firma de un consentimiento informado, a partir de biopsias de piel de pacientes con LCG tipo 1 y tipo 2. La piel se troceó de manera mecánica y se sometió a digestión enzimática con tripsina durante 20 minutos, a 37°C en agitación. Se retiró el sobrenadante, se añadió de nuevo tripsina y se realizó otro ciclo de digestión. El sobrenadante obtenido se juntó con el anterior y se centrifugó durante 7 minutos a 1000rpm. Para obtener los fibroblastos primarios, se retira primero el sedimento resultante de la centrifugación, que constituye la fracción de queratinocitos de la epidermis. Una vez extraídos los queratinocitos, la dermis se incubó 24 horas en colagenasa A (0,25% en PBS, Sigma). Después se recoge el sobrenadante, se centrifuga y el sedimento celular se siembra sobre una superficie de plástico.

El medio de siembra de los fibroblastos primarios es *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Gibco-BRL) suplementado con un 10% de suero fetal bovino, y primocin (100µg/ml; InvivoGen)

1.2 Cultivo de células mesenquimales humanas

Este procedimiento se realizó en colaboración con el Dr. Mariano García Arranz de la Unidad de Terapia Celular del Hospital Universitario La Paz. Las células mesenquimales de tejido adiposo se adquirieron ya extraídas procedentes de lipoaspirados de donantes sanos. Para el aislamiento de las células se siguió un tratamiento de colagenasa estándar; se centrifugó y se sembró el sedimento celular en frascos de plástico para cultivo. Se establecieron y caracterizaron los cultivos primarios de estas células según los criterios que marca la ISCT (*International Society for Cell Therapy*). En todos los experimentos se utilizaron células por debajo de un pase 10.

2. Diferenciación adipogénica de fibroblastos dérmicos humanos y tinción *Oil Red O*

Los fibroblastos que iban a ser diferenciados se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/ pocillo en el medio de cultivo detallado en el apartado 1.1. Se fue cambiando el medio cada 2-3 días hasta que las células llegaron a confluencia. Tras 3 días de confluencia, se procedió a la diferenciación adipogénica. Se probaron diferentes medios de cultivo, que variaban en los factores inductores de la adipogénesis y en su concentración. A continuación se describen las principales combinaciones testadas. Todas ellas tienen como base medio de cultivo de fibroblastos.

Medio	Insulina 10µg/mL	IBMX 0,5mM	Dexame- -tazona 1µM	Indometa- -cina 0,17mM	Pioglitazona 10 µM	Rosiglitazona 1 µM	Fenamilo 10 µM	Harmina 10 µM
1	√	√	√		√			
2	√	√	√	√				
3	√	√	√			√		√
4	√	√	√			√	√	
5	√	√	√			√		

Tabla 1

El medio de cultivo que conseguía una mayor eficiencia de diferenciación y el que se eligió para llevar a cabo el resto de los experimentos que se describen en esta tesis fue el medio 5. Éste se renovaba cada 2 días y se mantuvo durante 20 días en el caso de células mesenquimales y fibroblastos sin sobre-expresión de PPAR γ , y 10 días en fibroblastos con sobre-expresión del mismo. Los controles negativos fueron fibroblastos primarios cultivados el mismo número de días en presencia de medio de diferenciación completo. Para el análisis de la eficiencia de la diferenciación se llevó a cabo tinción de las células con el colorante *Oil-Red O* (ORO) (Sigma). Para ello, se fijaron previamente las células con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron los pocillos con PBS y con isopropanol al 60%. Se incubó en la solución de tinción ORO (0,3% en isopropanol: agua 3:2) durante 5 minutos en agitación suave y, por último, se hicieron 3 lavados con agua destilada. Las células se observaron en un microscopio óptico invertido

Olympus IX70 y se fotografiaron utilizando el software *Optika View 2*. El protocolo para la tinción con ORO de muestras histológicas es el mismo que el descrito para células. Adicionalmente, se pueden teñir tras el último paso con hematoxilina y eosina.

3. Producción de sobrenadantes virales

Los sobrenadantes retrovirales se generaron mediante cotransfección transitoria de tres plásmidos en la línea celular 293-T: dos plásmidos empaquetadores, uno portando los genes *gag-pol* y otro portador del gen *env* que codifica para la envuelta anfotrópica 4070 y, finalmente, un plásmido (VGIP-GFP o VGIP-PPARg) con el esqueleto retroviral conteniendo el transgén. Estos vectores retrovirales son autoinactivantes. El protocolo utilizado es el siguiente:

Día 0:

Se sembraron 2×10^6 células 293-T en placas P-100 en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%. Las células se dejaron crecer hasta un 50-60% de confluencia.

Día 1:

1. Antes de la transfección se cambió el medio a las células por 9ml de medio con cloroquina 25µM. Se incubaron a 37°C 1 hora.

2. En el momento de la transfección se prepararon las mezclas con los ADNs de los tres plásmidos llevándolas a un volumen final de 500µl con CaCl_2 0,25M. Sobre esa mezcla se añaden gota a gota 500µl de HBS 2X (HEPES 100mM (Gibco-BRL); NaCl 281 mM; Na_2HPO_4 1,5mM; pH 7,13). De esta manera se obtienen precipitados de Ca^{2+} -DNA en una solución salina de fosfatos. En esta situación precipitan formando agregados que son endocitados/fagocitados por las células.

3. La solución se añadió gota a gota sobre las células. Se movió la placa para distribuir el ADN.

4. Las células se incubaron a 37°C durante 8 horas. A continuación, se retiró el medio y se añadieron 10ml de medio fresco completo.

Los sobrenadantes retrovirales se recogieron a 24 y 48 horas después de la transfección y se filtraron por filtros de 0,22µm de poro. Esos sobrenadantes se utilizaron para infectar fibroblastos primarios humanos.

4. Transducción celular

5×10^5 fibroblastos humanos dérmicos a una confluencia del 30% se incubaron con sobrenadantes retrovirales, generados con el vector retroviral VGIP-PPAR γ o VGIP-GFP. Estos vectores fueron amablemente cedidos por el Dr. Enrique Sáez (*The Scripps Research Institute*, La Jolla, CA). La incubación se llevó a cabo durante 6-8 horas en presencia de polibreno (8 μ g/ml). Este proceso se realizó dos veces, en dos días consecutivos. Normalmente, se alcanzaron eficiencias de infección superiores al 90.

5. Experimentos de silenciamiento de AGPAT2 en MSC

Para este procedimiento se utilizaron vectores lentivirales comerciales de la colección *shRNA Plasmid Panels* de OriGene codificando ARNs de interferencia contra AGPAT2. Se siguieron los protocolos de producción de sobrenadantes virales y transducción celular detallados en los apartados 3 y 4.

6. Detección de leptina en el medio de cultivo celular

Las muestras de medio de cultivo se tomaron tras 72 horas sin cambiar el mismo. Se centrifugaron durante 3 minutos a 1200rpm para descartar restos celulares y se conservaron a -80°C. Los niveles de leptina humana fueron determinados mediante ELISA usando el kit “*Quantikine human leptin immunoassay*” (R&D Systems). Las muestras se analizaron en una dilución 1:10. Se siguieron las instrucciones especificadas en el manual

7. Extracción de ácidos nucleicos (ADN genómico y ARN)

7.1 ADN genómico

Para la extracción del ADN genómico se partió de 2×10^6 células. Éstas se lavaron con PBS y se centrifugaron durante 5 minutos a 2000rpm. Para la lisis se resuspendieron las células en 700 μ l de tampón de lisis (Tris-HCl 20mM, pH 8; EDTA 5mM, NaCl 400mM, SDS 1%) al que se le añaden 10 μ l de proteinasa K (20 μ g/ μ l)(Roche). A continuación, se incubaron a 55°C con agitación de 3 a 5 horas. Después, se añadió RNasa (5 μ g/ μ l)(Roche) durante 30 minutos a 25°C. El ADN se precipitó con un volumen de isopropanol (Scharlau) y centrifugación, y se lavó con etanol (Scharlau) al 75% seguido de centrifugación, para eliminar las sales residuales. El sedimento se dejó secar 10-15 minutos y se resuspendió en tampón TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM; pH 7,5).

7.2 ARN

El ARN de las células se aisló con Trizol (Gibco-BRL) y un rastrillo con el que se facilitó el despegado de las células del frasco de cultivo. Se añadió cloroformo (Merck) y, tras centrifugación de 15 minutos a 13000rpm, se recogió la fase acuosa. Se precipitó el ARN con isopropanol (Scharlau) y se centrifugó a 13000rpm durante 10 minutos. El sedimento se lavó con etanol (Scharlau) al 75% y se dejó secar al aire. Finalmente, se resuspendió en agua “*Nuclease free*”. El ARN obtenido se purificó usando el kit “*Turbo DNA free*” (Ambion) para la eliminación de posibles restos de ADN en las muestras.

8. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR para el análisis de las mutaciones de AGPAT2

El diseño de cebadores se realizó de forma manual con la asistencia de la herramienta *web Primer 3* (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). Este soporte informático permite seleccionar los cebadores idóneos teniendo en cuenta el porcentaje de guaninas y citosinas (GC) entre el 45 y 55%, la temperatura de fusión (T_m , del inglés *Temperature melting*) entre 52 y 65°C y el tamaño del cebador entre 18 y 21 pares de bases. Con la herramienta *web Rex Primer* (<http://www4a.biotec.or.th/GI/tools/rexprimer>) se comprobó la especificidad y no duplicidad en el genoma humano de cada uno de los oligonucleótidos diseñados. Se sintetizaron 1 ó 2 parejas de cebadores para cada uno de los exones del gen AGPAT2. A continuación se detallan las parejas de oligonucleótidos utilizadas:

	<u>Tamaño banda (pb)</u>
5'-Exón 1: 5'-ACC TAG CCC TTC CCT GCC-3'	545
3'-Exón 1: 5'-TGA CGC CGG CTC CTT GAC-3'	
5'-Exón 2a: 5'-TCG GCT GCG GGA TCT GTG-3'	420
3'- Exón 2a: 5'-CGC TGG AAG ACA GCT GCT G-3'	
5'-Exón 2b: 5'-CTC AGG GCC AGA CAC AGA G-3'	457
3'-Exón 2b: 5'-CTG CGG AGC ATG GAT GAT G-3'	
5'-Exón 3: 5'-CAT CCA TGC TCC GCA GGT G-3'	343
3'-Exón 3: 5'-ACC TGC TGC CTT AAG CCA G-3'	

5'-Exón 4: 5'-CAT GGC AGC AGC GAA GGC AG-3'	330
3'-Exón 4: 5'-CAC TCA TTC GGC CAC ATG GTC-3'	
5'- Exón 5: 5'-AGC AGG ACA CAT ATC CCA GG-3'	498
3'-Exón 5: 5'-GGT CCA TCC GTG TGA AGT CT-3'	
5'-Exón 6: 5'-AGG AAG CCC CTT CTG TCA CT-3	547
3'-Exón 6: 5'-AGC TGG GAA GAC ACA GCG T-3'	

Los reactivos usados para la reacción de PCR son los que se muestran a continuación:

Mezcla de reacción (Volumen final = 25 µl; Invitrogen):

ADN	1 µl
Tampón 10X	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Oligonucleótidos cebadores (10µM)	0,5 µl
Enzima Taq polimerasa (5u/µl,)	0.25 µl
H ₂ O destilada	19 µl

La amplificación de los fragmentos de ADN para el posterior genotipado de los exones se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polimerase chain reaction*). Se diseñaron programas específicos para cada pareja de cebadores, cuya estructura general es la siguiente:

5 minutos 94°C	} 35 ciclos ; X: temperatura específica para cada pareja de oligonucleótidos
30 segundos 94°C	
60 segundos X°C	
60 segundos 72°C	
10 minutos 72°C	

Tras la amplificación, el producto de reacción fue resuelto en geles de agarosa (*agarose D-1 low EEO*, Conda) del 1% en tampón de base tris, ácido bórico y EDTA (TBE Tris-Borato-EDTA) con 0,005% de bromuro de etidio y examinado en el transiluminador *Gel Doc xr+* (Bio Rad).

8.1 Purificación del producto de PCR

Las muestras se purificaron directamente del gel usando el kit "*QIAEX II Gel extraction kit*" (Qiagen). Para ello, se recorta con un bisturí la fracción de gel donde se encuentra incluida la muestra y se coloca en un tubo eppendorf. Se añaden 500µl del tampón de solubilización del kit y se incuba durante 10 minutos a 53°C, agitando manualmente a intervalos, hasta la completa disolución de la agarosa. Se añaden 12µl de la resina iónica Qiaex y se centrifuga a 13000rpm durante 1 minuto para descartar el sobrenadante. Se llevan a cabo 2 lavados seguidos de centrifugación con el tampón *PE* del kit y, finalmente, se resuspende la resina en tampón TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM; pH 7,5). Se centrifuga por última vez y se recoge el eluido, que contiene el ADN.

8.2 Secuenciación automática

Los fragmentos amplificados por PCR y purificados en gel, que constituyen los 6 exones del gen AGPAT2, fueron analizados por secuenciación automática. Se utilizaron placas de secuenciación de 96 pocillos (*26190 ultratampo Thin-Wall PCR Strip tubes and microplates*, Sorenson Bioscience). En cada pocillo se mezclan 5µl del producto de PCR, 1µl del cebador directo o reverso a una concentración de 5ng/µl, 2µl de tampón *BigDye* (Applied Biosystems) y 8µl de agua destilada para la PCR de secuenciación (95°C 30", 50°C 30", 72°C 4' en 25 ciclos). Las muestras fueron procesadas en el secuenciador automático *ABI PRISM 3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems) y analizadas con los programas *Sequencher 4.8*, *Chromas Pro 1.32* y la herramienta web *Lalign Server* (*ExPasy Bioinformatics Resource Portal*).

9. PCR de Transcripción Reversa

Tras verificar la integridad del ARN mediante observación del mismo en un gel-fosfato teñido con bromuro de etidio bajo la luz ultravioleta, se procedió a la reacción de transcripción reversa. Para esto, se utilizó 1µ de ARN y se siguieron las instrucciones especificadas en el kit "*SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR*" (Invitrogen). El ADN complementario resultante se amplificó mediante PCR con oligonucleótidos cebadores específicos para:

5'-GAPDH: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'

Tamaño banda (pb)

433

3'-GAPDH: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG T-3'	
5'-C/EBP α : 5'-GCA AAC TCA CCG CTC CAA TG-3'	229
3'- C/EBP α : 5'-TTA GGT TCC AAG CCC CAA GTC-3'	
5'-aP2: 5'-AAC CTT AGA TGG GGG TGT CCT G-3'	104
3'-aP2: 5'-TCG TGG AAG TGA CGC CTT TC-3	
5'-PPAR γ : 5'-ATT GAC CCA GAA AGC GAT TC-3'	86
3'-PPAR γ : 5'-CAA AGG AGT GGG AGT GGT CT-3	
5'-Leptina: 5'-GAA CCC TGT GCG GAT TCT TGT TGT G-3'	269
3'-Leptina: 5'-CGT TTC TGG AAG GCA TAC TGG TGA-3'	
5'-Adiponectina: 5'-TGG TGA GAA GGG TGA GAA-3'	220
3'-Adiponectina: 5'-AGA TCT TGG TAA AGC GAA TG-3	
5'-AGPAT 1: 5'-GTA GGA AAG AAA AGG TAC AGA GG-3'	716
3'-AGPAT 1: 5'-CAA AGA CCA ATC CTA CCT CCA GA-3'	
5'-AGPAT 2: 5'-CGA AGC TTC AAG TAC TTT TAC GG-3'	436
3'- AGPAT 2: 5'-GTG TTG TAG AAG GAG GAG AAG GAA-3'	
5'-AGPAT 3: 5'-TTA GCC TGT GCC TGT TAC AAC-3'	416
3'-AGPAT 3: 5'-CAG TCA AAT GTA GCC AAT CAC-3'	
5'-AGPAT 6: 5'-CAC AGC AGT CAC TGT GGA CT-3'	688
3'-AGPAT 6: 5'-CAC GAT CAT CTT GCT GTA CAG-3	

Los reactivos usados para la reacción de PCR son los que se muestran a continuación:

Mezcla de reacción (Volumen final = 25 μ l; Invitrogen):

ADN	1 μ l
Tampón 10X	2,5 μ l
MgCl ₂ (25mM)	0,75 μ l

dNTPs (10mM)	0,5 μ l
Oligonucleótidos cebadores (10 μ M)	0,5 μ l
Enzima Taq polimerasa (5u/ μ l, Invitrogen)	0,25 μ l
H2O destilada	19 μ l

El programa de reacción que se usó para la amplificación de las secuencias específicas fue el siguiente:

5 minutos 94°C	
30 segundos 94°C	} 35 ciclos ; X: temperatura específica para cada pareja de oligonucleótidos
60 segundos X°C	
60 segundos 72°C	
10 minutos 72°C	

La resolución de los productos de reacción se realizó en un gel de agarosa (*agarose D-1 low EEO*, Conda) del 1,5% en tampón de base tris, ácido bórico y EDTA (TBE Tris-Borato-EDTA) con 0,005% de bromuro de etidio y examinado en el transiluminador *Gel Doc xr+* (Bio Rad).

10. Extracción de proteínas celulares

Para este protocolo se partió de, aproximadamente, 2×10^6 células. Se lavaron con PBS y se añadieron 500 μ l de tampón de lisis (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, Tritón 1,5%, EDTA 1mM, Inhibidores de proteasas 1X). Se rascaron las células con un rastrillo para despegarlas de la superficie de cultivo y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Se centrifugó 10 minutos a 12000rpm y 4°C y se recogió la fase soluble. Se almacenó a -80°C para su posterior uso.

11. Western-blot

La concentración de proteínas extraídas de las células se determinó mediante el ensayo colorimétrico de Bradford (BioRad) usando una curva estándar de rango 1-20 μ g de BSA. Las muestras proteicas se resolvieron en geles de gradiente “*NuPAGE 4-12% Bis-Tris*” (Life Technologies), usándose 25 μ g de cada muestra. Se usó un voltaje constante de 100V. Posteriormente, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen) en cámara húmeda con medio de transferencia (Tris-Base 33 mM, Glicina 194 mM y Metanol 20%) a un amperaje constante de 0,40A durante 1 hora y 15 minutos. La membrana se incubó en una solución de leche desnatada 5% en TBS-Tween 0,5% (Tris-HCl 20mM, NaCl 137 mM, pH 7,6) durante 1 hora para el bloqueo de las uniones inespecíficas. Tras esto, se incubó la membrana con el correspondiente anticuerpo primario que detecta la proteína de interés: anti-PPAR γ monoclonal de

conejo (Cell Signalling) a una dilución 1:500. Para detectar la unión del anticuerpo primario se usaron anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa, concretamente, anticuerpos anti-IgG con especificidad de conejo (GE Healthcare), dilución 1:5000. Por último, para visualizar la unión de los anticuerpos se usó un kit de detección de luminiscencia ("*Pierce ECL Western Blotting Substrate*", Thermo Scientific) basado en la reacción específica de la peroxidasa y se procedió según las instrucciones de la casa comercial.

12. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Se realizaron cortes histológicos de 5µm de pieles humanas regeneradas fijadas en formol y embebidas en parafina y, por otra parte, criocortes de 5µm de pieles humanas regeneradas y embebidas en OCT (*Optimal Cutting Temperature*)(Tissue-Tek).

Para el análisis inmunohistoquímico, las muestras se bloquearon por incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos con suero de caballo 5% y BSA 1% en PBS conteniendo Tritón (Merck) 0,1%. A continuación, se incubaron durante 1 hora a 37°C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en PBS-Tritón 0,1% con suero de caballo 1% y BSA 0,2%. El anticuerpo usado fue monoclonal anti-GFP (Molecular Probes Inc.) y la incubación se realizó en una dilución 1:200. Este anticuerpo reconoce la proteína GFP con la que marcamos las células humanas para poder diferenciarlas de las murinas. Posteriormente, las muestras se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS-Tritón 0,1% y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario *Donkey anti-rabbit* marcado con biotina (Jackson ImmunoResearch) a una dilución 1:500. A continuación, se lavaron las muestras 3 veces durante 5 minutos con PBS-Tritón 0,1%. La detección del anticuerpo se realizó mediante el sistema avidina/estreptavidina-peroxidasa, utilizando el kit "*Vectastain ABC*" (Vector Laboratories). El revelado se lleva a cabo añadiendo el substrato DAB y H₂O₂ (Vector Laboratories). La reacción química se paró con agua, controlando la reacción con el microscópico óptico. Por último, se contratiñeron las muestras con hematoxilina y eosina.

Para el análisis de expresión de PPAR γ en las pieles regeneradas mediante inmunofluorescencia, los criocortes se fijaron en metanol y acetona fríos (relación 1:1) durante 10 minutos a 4°C. Se lavaron las muestras con PBS-Tritón 0,1% y se bloquearon por incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos con suero de caballo 5% y BSA 1% en PBS-Tritón 0,1%. La incubación con el anticuerpo primario se hizo a temperatura ambiente durante 1 hora y el anticuerpo elegido fue anti-PPAR γ monoclonal de conejo (Cell Signalling) a una dilución 1:200. Como anticuerpo secundario se usó Alexa fluor-488 *Goat anti-rabbit* (Molecular Probes Inc.) a una dilución 1:1000. Una vez lavados los criocortes, se montaron con Mowiol (Sigma) al que se añadió DAPI (200µg/ml) para la detección de

los ácidos nucleicos (marcaje nuclear). Por último, se visualizaron las muestras con microscopio de fluorescencia *Zeiss Axiophot*.

13. Extracción de lípidos celulares por el Método Folch

Todos los procedimientos que se describen en los puntos 13-17 fueron realizados en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Rosario Domingues (Universidad de Aveiro, Portugal). Partimos de 1×10^6 células. El primer paso para la extracción celular de lípidos es la tripsinización de las células y su resuspensión en 1,5ml de agua MiliQ en tubos de vidrio. Sobre esa suspensión se añaden 4ml de cloroformo (Merck) y 2ml de metanol (Scharlau). A continuación, se centrifugan los tubos a 2000rpm durante 5 minutos y se recoge la fase orgánica. Se desecan las muestras bajo flujo de nitrógeno y se conservan en frascos opacos a -20°C hasta su uso.

14. Cuantificación de fosfolípidos totales (PL)

El extracto lipídico obtenido y desecado en el apartado anterior, se resuspendió en 350μl de cloroformo, apartándose 50μl para la posterior cuantificación de triglicéridos y colesterol. Se trasvasaron 10μl de cada muestra a tubos de vidrio largos. A dichos tubos se añadieron 0,650ml de ácido perclórico (Sigma). Se lleva a cabo una hidrólisis de las muestras a 180°C durante una hora en un termobloque. Una vez que los tubos se igualan a la temperatura ambiente, se añaden 3,3ml de agua MiliQ, 0,5ml de molibdato amónico (Sigma) y 0,5ml de ácido ascórbico (Merck). Se introdujeron las muestras en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos y, por último, se cargaron 200μl de cada muestra, por triplicado, en pocillos de una placa P96 (Falcon) de lectura. Se midió la absorbancia a una longitud de onda 800nm mediante espectrofotometría. El análisis numérico de los datos se hizo usando el software *Microsoft Excel 2010*, mediante regresión lineal.

15. Cuantificación de triglicéridos (TG) y colesterol (COL)

Estos experimentos se llevaron a cabo usando los kits "*Liquick Cor-TG 30 mini*" (Cormay) para la cuantificación de los triglicéridos y "*Liquick Cor-CHOL mini*" (Cormay) en el caso del colesterol. Tanto para el aspecto técnico como para el análisis de los resultados se siguieron las instrucciones especificadas por el fabricante.

16. Separación de fosfolípidos mediante cromatografía de capa fina

Para la cromatografía de capa fina, se utilizó como fase estacionaria gel de sílice soportado en una placa de vidrio de 20x20cm y 250μm de grosor (*Thin layer chromatography plates Partisil 60A*, Whatman). El primer paso consistió en equilibrar la placa de sílice, para lo cual se sumerge la misma en una solución de metanol (Scharlau) y cloroformo (Merck) en relación 1:1, contenida en una

cubeta de vidrio (*Latch-lid TLC development chamber*, Sigma) con tapa para que se sature la atmósfera. Cuando la fase líquida ha cubierto por capilaridad la totalidad de la placa, se deja secar durante 3-4 horas en campana de extracción de gases. Posteriormente, se rocía con ácido bórico (Sigma) en spray. Para eliminar la humedad de la placa se incuba durante 30 minutos en una estufa a 100°C. Hecho esto, se procede a cargar los lípidos patrones y las muestras (30µg) por duplicado. A continuación, se introduce la placa cargada en una cubeta de vidrio que contiene cloroformo (Merck), etanol, agua y trietilamina (relación 30/35/7/35), para permitir que el eluyente (fase móvil) ascienda por capilaridad. Cada componente de la mezcla avanza una determinada distancia en función de su afinidad por la fase estacionaria. Al cabo de unas 3 horas, los componentes de la muestra se han separado por completo y se deja secar la placa en una campana de extracción. El revelado se realiza con un spray de primulina (Sigma) y una lámpara de luz ultravioleta (UV) para permitir la visualización de los compuestos. Cada banda puede relacionarse con uno de los patrones lipídicos y, una por una, fueron rascadas con una espátula y recogidas en un tubo de vidrio. El siguiente paso consiste en añadir 0,650ml de ácido perclórico (Sigma) y a partir de este paso se procede de manera idéntica a la detalla en el apartado 15 para la cuantificación de los fosfolípidos totales. El análisis de los datos también es el mismo.

17. Espectrometría de masas

La preparación de las muestras para la espectrometría de masas consiste en disolver 1µl de la muestra a inyectar en 100µl de metanol (Scharlau). El análisis de los triglicéridos se llevó a cabo mediante espectrometría de masas de ionización por electrospray, empleándose un electrospray Q-ToF 2 (Micromass) como se describe a continuación: voltaje del capilar de 3kV (modo positivo) y voltaje de cono de 30V. La temperatura de la fuente fue 80°C y la temperatura de desolvatación 150°C. Se empleó Argón como gas de colisión, en un rango energético de 30-40V. Para la adquisición de datos se utilizó el software “*Mass Lynx data system (V4.0)*”(Archer et al., 2013).

18. Preparación de equivalentes dérmicos y dermo-epidérmicos y trasplante a ratones inmunodeficientes

Para el componente dérmico de los equivalentes se utilizó una matriz de fibrina en la que se embebieron los fibroblastos de paciente lipodistrófico marcados con la proteína GFP y/o PPARg por transducción viral. Como fuente de fibrina se utilizó el fibrinógeno procedente del crioprecipitado de plasma de sangre humana. El plasma fue congelado a -80°C durante al menos 2 horas y descongelado a 4°C para obtener el crioprecipitado. Éste se recogió en tubos Falcon de 50ml y se centrifugó a 3500rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue desechado y el sedimento se

resuspendió en 10ml de NaCl 0,9%. Finalmente, se incubó a 37°C para disolver completamente el fibrinógeno. El gel de fibrina se preparó con 12ml de medio de cultivo de queratinocitos (DMEM y HAM'S F12 suplementado con un 10% de suero fetal bovino, insulina (5mg/ml; Sigma), toxina colérica (88ng/ml; Sigma), hidrocortisona (0,4mg/ml; Sigma) y tirosina triyodada (1,3ng/ml; Sigma). Sobre ese medio se añaden 5×10^5 fibroblastos dérmicos humanos, 500UI de aprotinina bovina (Trasitol, Bayer), 11UI de trombina bovina (Sigma) diluida en 1ml de CaCl_2 0,025nM y 3ml de la solución de fibrinógeno (crioprecipitado). La mezcla se siembra en 2 pocillos de 35mm (placa de 6 pocillos) y se deja solidificar a 37°C durante 2 horas. Este proceso se repite las veces necesarias para conseguir el número de trasplantes deseado. Para el componente epidérmico (en los geles que lo contenían) se usaron 5×10^5 queratinocitos de donantes sanos que fueron sembrados sobre la matriz de fibrina y cultivados hasta alcanzar la confluencia. En ese momento, las pieles bioingenierizadas fueron separadas manualmente de la superficie de cultivo e injertadas en ratones inmunodeficientes. Los trasplantes se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad usando hembras de ratón desnudo (fondo genético NMRI-Foxn1nu /Foxn1nu RjOrl, Janvier Labs) de 6 semanas de edad y mantenidas en condiciones libres de patógenos durante la duración del experimento en el animalario del Centro de Investigaciones Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT). Para el trasplante de los equivalentes se realiza una herida en el dorso del animal del mismo tamaño que el equivalente dermo-epidérmico que se trasplantará. El equivalente dermo-epidérmico se despega de la superficie de la placa de cultivo y se trasplanta ortotópicamente a la herida generada. A continuación, se cubre con la piel que había sido retirada para generar la herida, tras desvitalizarla mediante tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido/descongelación a 37°C, sujetándola mediante sutura al borde de la piel de la herida. El tiempo que tarda en caerse por sí misma, es el mismo que necesita el trasplante para convertirse en una piel totalmente regenerada. En el caso de los trasplantes subcutáneos, se realizaron por el método Barrandon (Barrandon et al., 1988). Al cabo de 4 semanas, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los injertos cutáneos para el análisis histológico.

19. Administración oral de rosiglitazona a los ratones

Se administró a los animales 0,2g de rosiglitazona disueltos en 100µl de agua esterilizada, por vía oral, una vez al día durante 3 semanas. Para la administración del fármaco se utiliza una sonda gástrica, metálica y rígida que se introduce por el esófago del ratón, previamente inmovilizado por pinzamiento, asegurándose de que no se está ingresando en la vía respiratoria ni tocando la mucosa gástrica. La sonda se introduce suavemente por el lateral de la boca del animal, acompañándolo con

un ligero movimiento de tal manera que el animal desplace su cabeza hacia atrás para facilitar la entrada hacia el esófago. Una vez suministrada la sustancia, la sonda se retira suavemente.

RESULTADOS

RESULTADOS

En este trabajo de tesis doctoral nos hemos centrado en el desarrollo de una estrategia experimental de terapia génica para generar eficientemente adipocitos humanos funcionales, a partir de fibroblastos dérmicos de pacientes con LCG, capaces de resolver las alteraciones metabólicas derivadas de la ausencia de tejido adiposo que caracteriza a la LCG. Inicialmente, previmos que este abordaje supondría, en primer lugar, la reprogramación de fibroblastos para hacerlos competentes al estímulo adipogénico y, posteriormente, la restitución de la función de los genes mutados. Sin embargo, nuestro abordaje permitió llevar a cabo todo el proceso gracias a un único evento molecular.

1. Diagnóstico genético de un paciente de Lipodistrofia Congénita Generalizada de tipo 1

La LCG de tipo 1 es ocasionada por mutaciones en el gen AGPAT2, las cuales aparecen recogidas en la Tabla 2. Al tratarse de una enfermedad de herencia autosómica recesiva, es necesaria la concurrencia de 2 mutaciones en el mismo gen para que se manifieste el fenotipo clínico. En la primera parte de este estudio hemos utilizado células dérmicas procedentes de biopsias de piel de un paciente con esta variedad de LCG, que fueron expandidas en cultivo para ser utilizadas posteriormente en diferentes procedimientos experimentales. Como punto de partida de la tesis, nos propusimos determinar las mutaciones de AGPAT2 presentes en esas células. Para ello, se extrajo el ADN de las mismas y se secuenciaron los 6 exones del gen AGPAT2. El análisis permitió, por una parte, detectar la presencia de una mutación puntual en el exón 2, que aparece en heterocigosis, como demuestra el doble pico del cromatograma (Figura 8b). Esta mutación consiste en el cambio en el ADN de la citosina 202 por una timina, que genera el cambio de la arginina 68 por un codón de terminación prematuro (Arg68X). Por otro lado, la segunda mutación del paciente se hizo sólo evidente al observar un fragmento de cADN, obtenido mediante RT-PCR para el gen AGPAT2, que presentaba menor tamaño que el cADN salvaje (Figura 8c). La secuenciación demostró que esta banda de menor movilidad era consecuencia de la delección de los exones 3 y 4 del gen, debida a la mutación Gly106fsX188, que provoca un cambio de la pauta de lectura después de la glicina 106, introduciéndose 188 aminoácidos nuevos después de los cuales se genera un codón de terminación. Estas dos mutaciones ya habían sido descritas previamente (Tabla 2) (Agarwal et al., 2002; Gomes et al., 2004) y fueron posteriormente confirmadas dentro del protocolo clínico de reposición de leptina, llevado a cabo por el NIH en Estados Unidos, en el que se encuentra enrolado nuestro paciente.

Mutaciones descritas en el gen AGPAT2		
Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Origen de la mutación
202C→T	Arg68X	Europeo (Turquía y Bélgica)
IVS4-2A→G	Gln196fsX228	Afro-americano
377insT	Leu126fsX146	Afro-americano
683T→C	Leu228Pro	Afro-caribeño
418delTTC	140delPhe	Afro-caribeño
712A→T	Lys215X	Afro-americano
IVS3-1AG-C	Asn164fsX249	Africano, Brasil
636C→A	Phe189X	Brasil
317-588del (ex3-4del)	Gly106fsX188	Brasil
716C→T	Ala239Val	Europeo
916C→G 3' UTR	-	Europeo
504delGA	Val167fsX183	Europeo
406G→A	Gly136Arg	Europeo
IVS5-2A→C	221delGlyThr	Latino-americano

Tabla 2

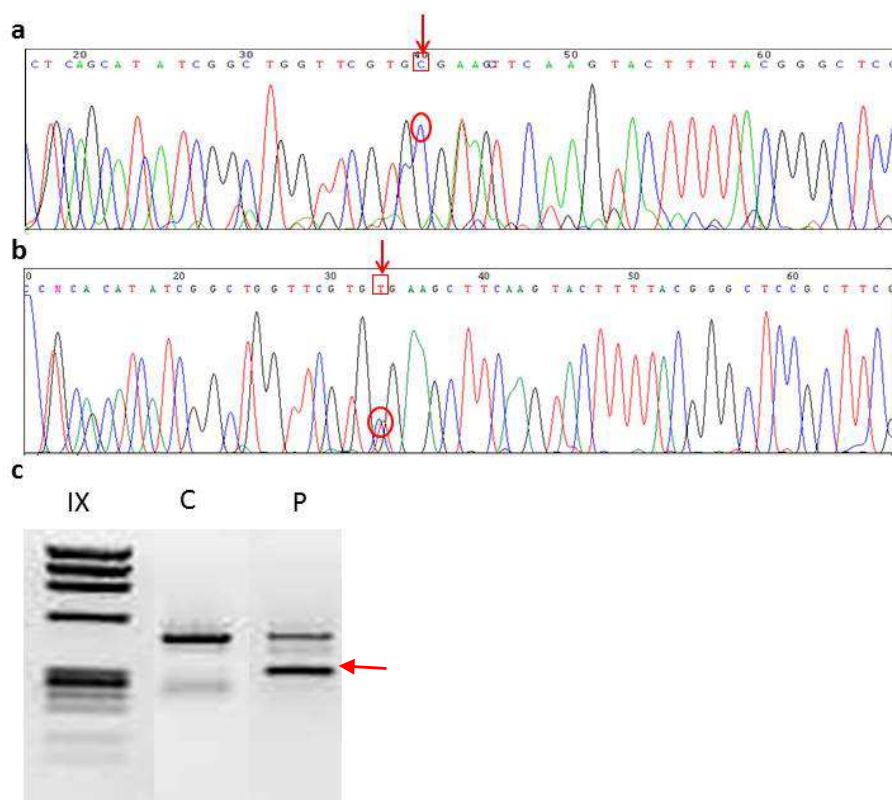


Figura 8: Diagnóstico genético de paciente de LCG tipo 1. a) Cromatograma que muestra la secuencia *wild type* del exón 2 del gen AGPAT2. b) Secuencia correspondiente al exón 2 del gen AGPAT2 del paciente, donde se puede ver la presencia de la mutación 202C/T en heterocigosidad. c) RT-PCR del gen AGPAT 2 de un donante sano (C) y del paciente de LCG tipo 1 (P), donde se aprecia una banda de menor movilidad (flecha) debida a la delección de los exones 3 y 4.

2. Estudios *in vitro* en células CGL tipo 1

2.1. Establecimiento de condiciones optimizadas de inducción de la diferenciación adipogénica de fibroblastos dérmicos humanos. Análisis comparativo de la diferenciación de células de donante sano y de paciente con LCG tipo 1

Ha sido previamente descrito que los fibroblastos dérmicos humanos constituyen una población altamente heterogénea (Goldring et al., 1990; Sorrell et al., 2007, 2008) dentro de la cual existe un pequeño porcentaje de células con propiedades de célula madre mesenquimal (MSC), las cuales serían susceptibles de sufrir diferenciación adipogénica en presencia de los estímulos apropiados. La elección de los fibroblastos dérmicos humanos como material celular para desarrollar estos experimentos vino dada por la dificultad de acceder directamente a las MSC de paciente. Éste sería el tipo celular óptimo ya que es el precursor de los adipocitos, entre otros tipos celulares. Sin embargo, su obtención no era posible debido a que los tejidos donde residen estas células de forma mayoritaria implicaban procedimientos muy invasivos, como la extracción de médula ósea, o resultaban impracticables, ya que los pacientes lipodistróficos carecen de grasa corporal, órgano en el que son abundantes las MSCs. Por lo tanto, en una primera aproximación los experimentos se realizaron con fibroblastos dérmicos humanos de donante sano (HF) y de paciente con LCG de tipo 1 (LD) no modificados genéticamente, esperándose observar diferencias a nivel de la diferenciación adipogénica inducida en la población minoritaria de MSC. Tres días después de alcanzarse la confluencia celular, los fibroblastos fueron expuestos a medios de cultivo conteniendo distintas combinaciones de factores activadores de la adipogénesis que actúan sobre diferentes mecanismos: agonistas de PPAR γ , activadores de C/EBP α/β , agonistas del AMP cíclico etc. Pudimos observar como a partir de 6-7 días en presencia de los medios de cultivo 1, 3 y 5 (Tabla 1) los fibroblastos control HF adquirían una morfología redondeada y un tamaño menor al inicial. A día 12, comenzó a apreciarse la acumulación de lípidos en vesículas redondeadas y refringentes en un pequeño porcentaje de los HF (Figura 9a-d), mientras que ninguno de estos cambios fue visible en presencia de los medios de cultivo 2 y 4 (imágenes no mostradas). De forma remarcable y coherente con el fenotipo de ausencia de grasa en pacientes lipodistróficos, no se produjeron cambios morfológicos ni formación de vesículas lipídicas en los fibroblastos LD con los medios de cultivo empleados, indicando que estas células, aun en el caso de poseer la subpoblación con propiedades multipotentes, no estaba siendo capaz de diferenciar a adipocitos (Figura 9e-h). En segundo lugar, se procedió a la cuantificación de las células diferenciadas, determinándose el número de células que contenían vesículas de grasa en diferentes áreas del cultivo. Este análisis demostró un porcentaje

máximo de diferenciación de los HF del 0,2%, con el empleo del medio de cultivo número 5 (Figura 9i).

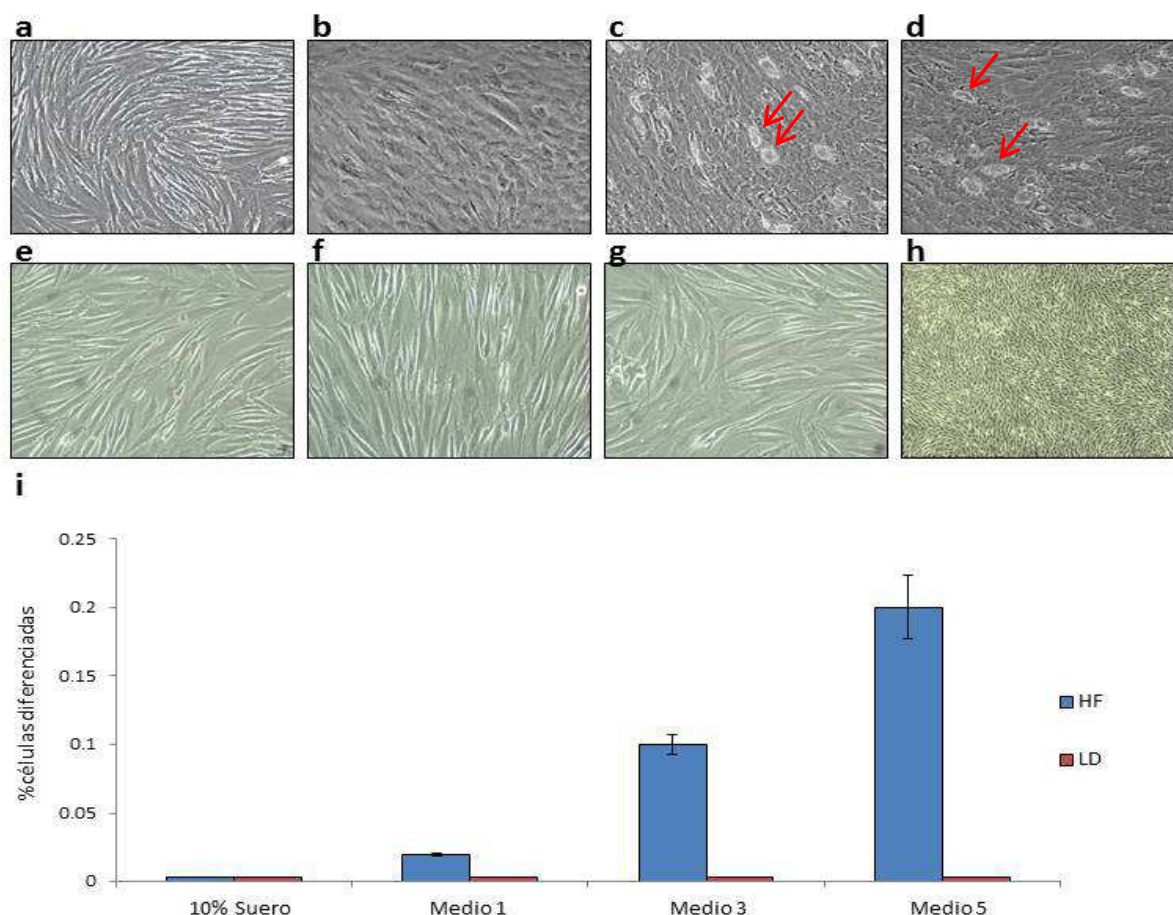


Figura 9: Microscopía de contraste de fases de fibroblastos dérmicos control (HF) (a-d) y de paciente LCG tipo 1 (LD) (e-h) tras 21 días en presencia de diferentes medios de cultivo: a) y e) 10% de suero, b) y f) medio de diferenciación 1, c) y g) medio de diferenciación 3, d) y h) medio de diferenciación 5. Las flechas señalan algunas de las células diferenciadas. Aumento 100X. i) Cuantificación del porcentaje de células diferenciadas

2.2. Expresión forzada de PPAR γ -1 como factor reprogramador de fibroblastos dérmicos

A pesar de las diferencias observadas en los fibroblastos no modificados genéticamente, los valores absolutos de células diferenciadas eran muy pequeños como para adquirir significación y relevancia práctica. Por este motivo, nos propusimos reprogramar las células control HF y las lipodistróficas LD en células respondedoras al estímulo adipogénico. Para ello, ambos tipos de fibroblastos fueron transducidos con el vector retroviral (V-PPAR γ -1) portador del cADN codificante para PPAR γ , principal activador de la adipogénesis (Cristancho and Lazar, 2011), bajo el control de las secuencias promotoras del CMV (Figura 10b). Como controles, se infectaron en paralelo los fibroblastos HF y LD con un vector retroviral idéntico al anterior denominado V-CTRL, en el cual se había sustituido el cADN de PPAR γ -1 por la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (GFP) (Figura 10a).

Para detectar la expresión de PPARg en las células transducidas, se llevó a cabo una tinción por inmunofluorescencia usando un anticuerpo específico anti-PPARg. Los núcleos celulares fueron

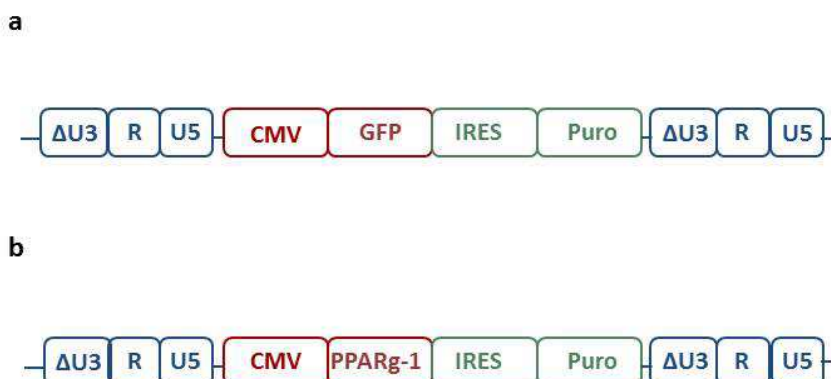


Figura 10: Estructura del vector retroviral usado como control **(a)** y para la sobreexpresión de PPARg-1 **(b)** en fibroblastos dérmicos humanos.

marcados con DAPI. La inmunofluorescencia demostró que las células transducidas con el vector V-PPARg-1 expresaban PPARg en un porcentaje superior al 50%. Este porcentaje de transducción era similar en las células infectadas con el vector V-CTRL (Figura 11a) en base a la fluorescencia de GFP. La expresión se cuantificó de forma adicional a partir de extractos proteicos de HF y LD transducidos con los vectores V-CTRL o V-PPARg-1, analizados mediante Western-blot con el mismo anticuerpo anti-PPARg usado en la inmunofluorescencia. Esta técnica confirmó la sobreexpresión de proteína PPARg-1 en los fibroblastos HF y LD por infección con el vector retroviral V-PPARg-1. En varios experimentos, la expresión de PPARg-1 endógeno en las células control (infectadas con el vector V-CTRL) fue muy baja o indetectable (Figura 11a, b).

Los vectores retrovirales V-CTRL y V-PPARg-1 contienen en su secuencia un casete de resistencia al antibiótico puromicina. A pesar de que la eficiencia de la transducción del vector V-PPARg-1 fue alta tanto en fibroblastos HF como en LD (Figura 11a), para intentar conseguir una población en la que el 100% de las células fueran capaces de experimentar diferenciación adipogénica, se diseñó un experimento de selección positiva con puromicina. Se cultivaron las células transducidas con los vectores retrovirales en presencia de 2 concentraciones diferentes de puromicina: 0.5μg/ml y 1μg/ml. Mediante microscopía de contraste de fases fue claramente visible como en presencia de puromicina 0.5μg/ml, un alto porcentaje de los HF transducidos con V-CTRL o V-PPARg-1 comenzaba a morir al cabo de 3-4 horas, el cual se correspondería con las células que no habían incorporado el ADN viral a su genoma (Figura 12b, e). En presencia del antibiótico a concentración 1μg/ml (Figura 12c, f) la muerte celular se producía en solo una hora, no observándose células vivas al cabo de 2 días. Se determinó, por tanto, que la concentración óptima para la selección era

0.5µg/ml. Sin embargo, una vez expuestas al antibiótico a concentración 0.5µg/ml, las células entraban en un estado de senescencia del que no se recuperaban a pesar de sustituirse el medio de cultivo por uno fresco sin puromicina, produciéndose la muerte del 100% de las células al cabo de 8-10 días. Lo mismo sucedía con las células LD infectadas con V-CTRL o V-PPARg-1 (datos no mostrados). Por tanto, a pesar de estar transducidas con los vectores V-CTRL o V-PPARg-1 (portadores del casete de resistencia a la puromicina), ninguna célula sobrevivía a largo plazo en las concentraciones de antibiótico que se emplean habitualmente para realizar esta selección. La puromicina resulta ser demasiado tóxica cuando coexiste con la sobreexpresión de PPARg-1 para este tipo celular, lo que nos ha impedido obtener una población que exprese PPARg-1 de manera homogénea. Así, considerando que el porcentaje de células transducidas era elevado (>50%, determinado por inmunofluorescencia anti-PPARg), se determinó continuar con el resto de los procedimientos experimentales a pesar de no poder llevarse a cabo la selección celular.

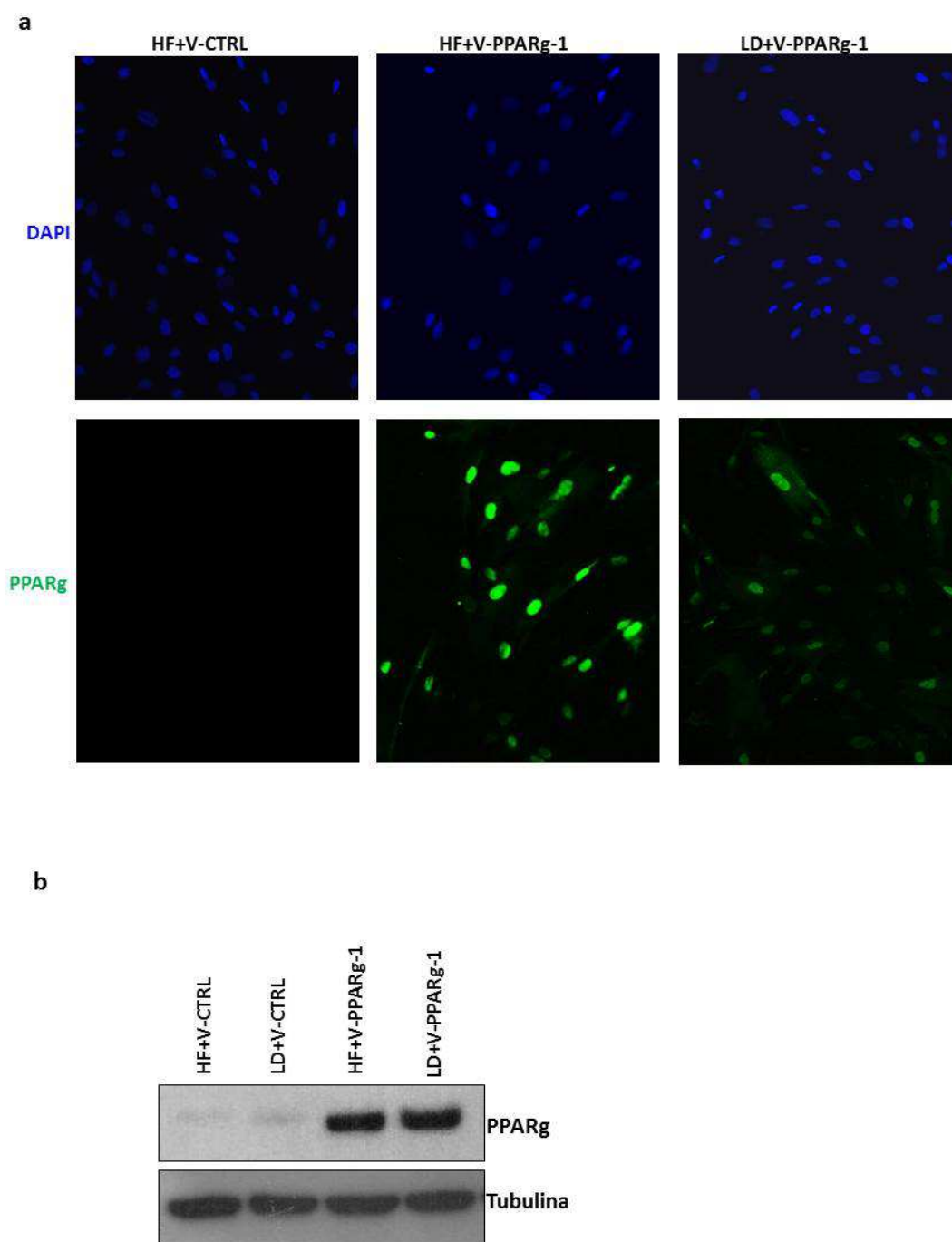


Figura 11: Detección de la expresión de PPARG en células HF y LD transducidas con un vector retroviral control (V-CTRL) o un vector retroviral que codifica para PPARG-1 (V-PPARG-1). a) Inmunofluorescencia realizada con anticuerpo anti-PPARG. b) Western-blot realizado con anticuerpo anti-PPARG. La tubulina se utilizó como control de carga.

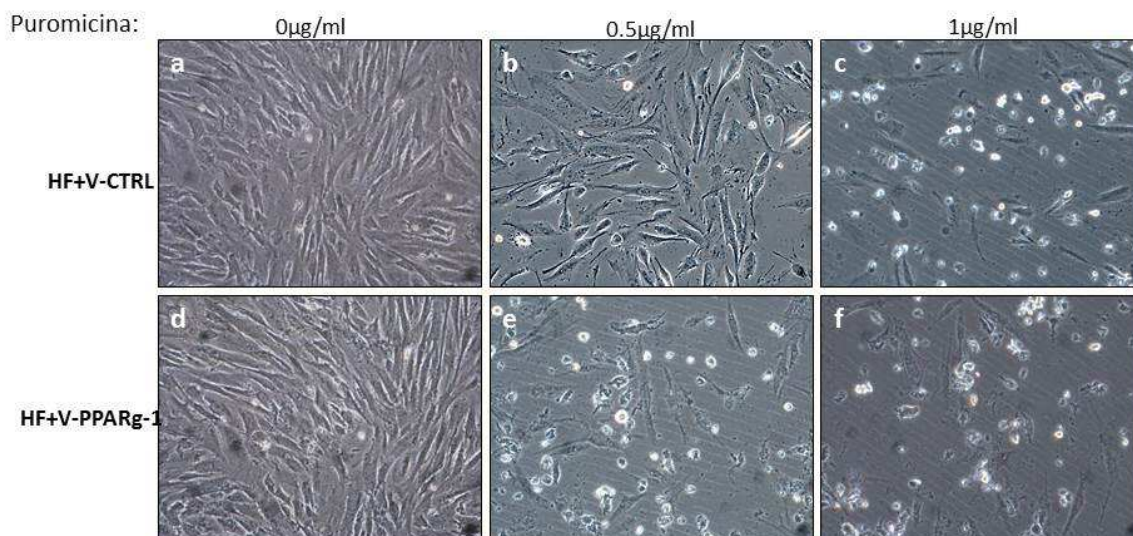


Figura 12: Selección positiva de HF transducidos con un vector retroviral control (V-CTRL) (a-c) y un vector retroviral codificante para PPAR γ -1 (V-PPAR γ -1) (d-f) mediante la adición de puromicina al medio de cultivo durante 24 horas. Concentraciones finales de puromicina en el medio: 0 μ g/ml (a, d), 0.5 μ g/ml (b, e) y 1 μ g/ml (c, f). Ambos vectores contienen un casete de resistencia a la puromicina. Aumento 100X.

2.3. Inducción de la diferenciación adipogénica de fibroblastos reprogramados con el vector retroviral V-PPAR γ -1

Para comprobar si la sobreexpresión de PPAR γ -1 en fibroblastos conducía a su reprogramación haciéndolos susceptibles de responder al estímulo de diferenciación adipogénica, los HF fueron expuestos al medio de diferenciación número 5 (medio DIR a partir de aquí) durante 10 días, una vez alcanzada la confluencia del cultivo. En este análisis incluimos también MSCs procedentes de un donante sano, que se cultivaron en presencia del mismo medio de cultivo pro-adipogénico y fueron utilizadas como control positivo del ensayo. A día 3 desde la adición del medio DIR, ya fue posible distinguir las primeras vesículas lipídicas incipientes en el interior de las células dérmicas transducidas con PPAR γ -1. En las células MSCs este proceso comenzó a observarse a día 6. Tras 10 días en presencia del medio DIR se alcanzó el máximo de la diferenciación adipogénica de los fibroblastos control HF, ya que el número de células diferenciadas no se incrementó a días posteriores. En este punto, la cuantificación demostró que el 40% de las MSCs, y el 75% de los HF (en el experimento mostrado en la figura 13) presentaban acumulación citoplasmática de vesículas lipídicas (Figura 13a, b, g). Por último, la tinción con el colorante lipofílico *Oil Red O* confirmó la diferenciación, visualizándose en color rojo la grasa sintetizada por las células (Figura 13d, e). Estos resultados no se observaron en las células infectadas con el vector control V-CTRL (inserto de figura 13e, f). La expresión forzada de PPAR γ -1 estaba, por tanto, permitiendo la diferenciación de los HF en tiempos más cortos y en porcentajes superiores a los obtenidos con las MSCs, controles positivos

del experimento. Las MSCs requirieron 20 días en presencia del medio DIR para alcanzar el máximo nivel de síntesis de lípidos y el porcentaje de células diferenciadas no superó el 50%.

2.4. Adipogénesis en fibroblastos LD reprogramados por sobreexpresión de PPAR γ -1

Una vez confirmado el potencial de diferenciación adipogénica que les confiere la sobreexpresión de PPAR γ -1 a los fibroblastos control HF, se procedió a utilizar esta estrategia de reprogramación en los fibroblastos lipodistróficos LD. Una vez transducidas y habiendo alcanzado la confluencia, estas células fueron expuestas al medio de cultivo DIR durante 10 días. Inesperadamente y de manera análoga a lo que sucedía con los HF, observamos la formación de vesículas lipídicas en el citoplasma de los fibroblastos LD reprogramados 3 días después de la adición del medio DIR. A día 10, cuando se alcanzó el máximo de la diferenciación, se pudo cuantificar el porcentaje de células diferenciadas, que alcanzó un valor del 55% en el experimento que se enseña en la figura 13 (Figura 13c, g). La tinción con *Oil Red O* confirmó la naturaleza lipídica de las vesículas formadas en células LD (Figura 13f). Por tanto, al forzar la expresión de PPAR γ -1 en células LD (en presencia del coctel adipogénico) se consigue inducir la síntesis y acumulación de lípidos en su citoplasma siguiendo el mismo patrón temporal que en los HF reprogramados, a pesar de carecer del gen AGPAT2 funcional (Figura 13c, f).

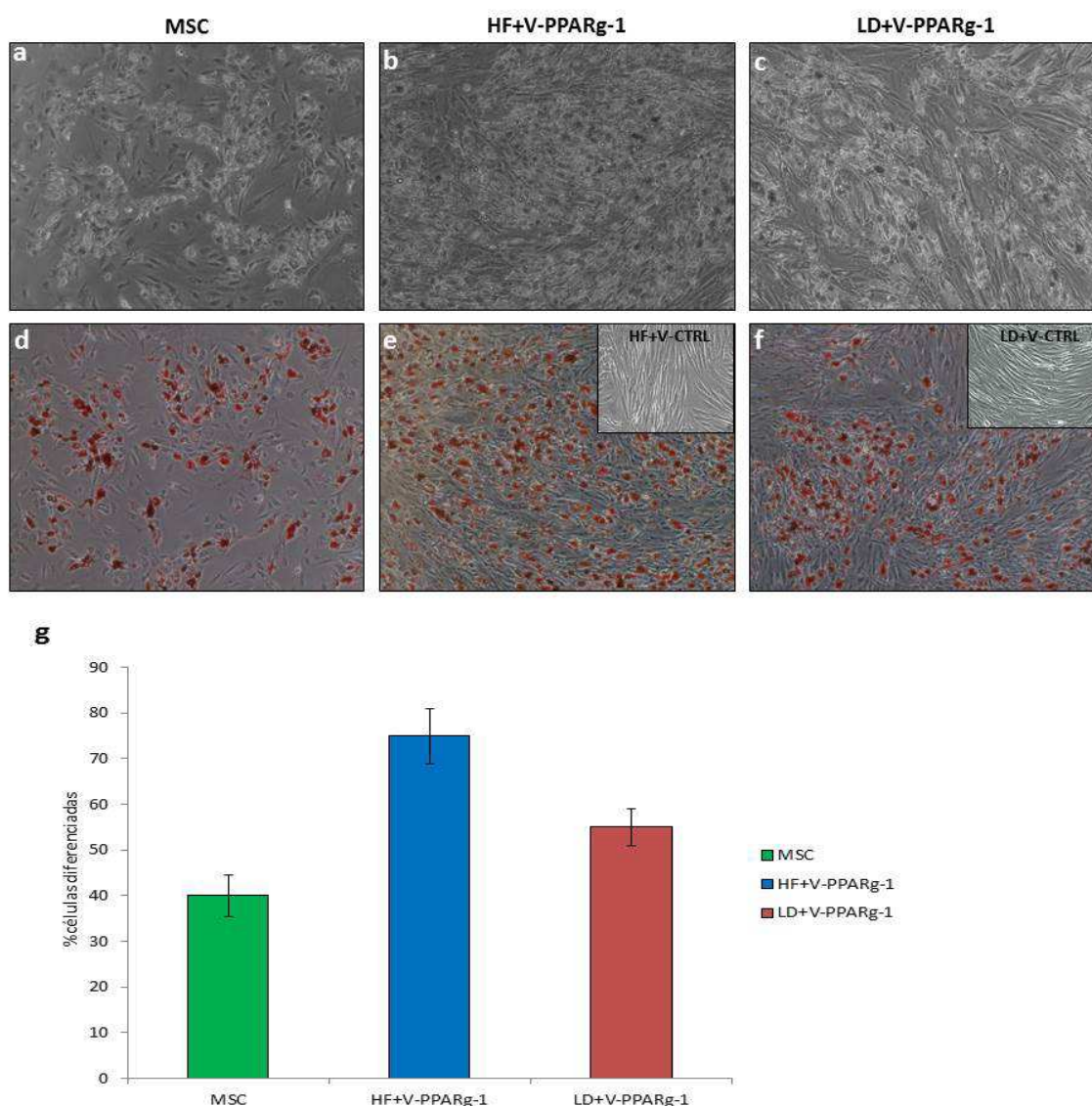


Figura 13: Imágenes de MSC, HF y LD transducidos con el vector V-PPARγ-1 tras 10 días en presencia del medio de diferenciación DIR. a-c): contraste de fases; d-f) tinción con el colorante *Oil Red O*. Los insertos corresponden a las células transducidas con el vector V-CTRL. Aumento 100X. **g)** Cuantificación del porcentaje de células diferenciadas a adipocitos de cada tipo celular.

2.5. Correlación directa entre la sobreexpresión de PPARγ y la formación de vesículas lipídicas en fibroblastos LD

Si bien la evidencia a nivel global indicaba que las células que sobreexpresaban PPARγ eran capaces de producir una respuesta adipogénica, quisimos demostrar, especialmente en las células lipodistróficas LD, que el efecto no era indirecto (por ejemplo, mediado por factores solubles), sino que dependía específicamente y de manera autónoma de la sobreexpresión de PPARγ. Debido a la imposibilidad de generar una población homogénea de células en la que todas ellas expresasen PPARγ-1, analizamos si la formación de vesículas lipídicas era exclusiva de aquellos fibroblastos con

sobreexpresión de PPARg. El análisis por inmunofluorescencia, con un anticuerpo anti-PPARg, en células LD reprogramadas (transducidas con V-PPARg-1) y cultivadas en presencia del medio DIR durante 10 días, permitió demostrar la correlación entre la diferenciación adipogénica y la sobreexpresión de PPARg. La figura 14 muestra cómo las células con vesículas lipídicas en su citoplasma son positivas para la expresión nuclear de PPARg, mientras que las células que no han diferenciado son negativas a la tinción fluorescente del anticuerpo.

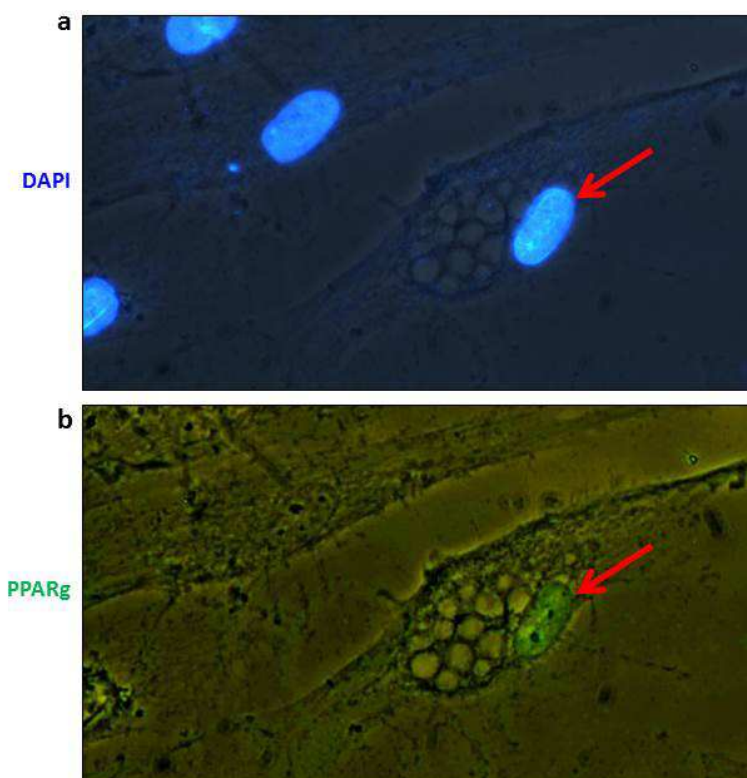


Figura 14: Detección de PPARg por inmunofluorescencia en células LD transducidas con el vector retroviral V-PPARg-1 tras 10 días desde la inducción de la diferenciación adipogénica. En el panel superior (a) se muestra la tinción de los núcleos (DAPI) de un campo que contiene células no diferenciadas y una claramente diferenciada a adipocito (flecha). En el panel inferior (b) se observa que la célula diferenciada (flecha) es la que expresa PPARg con localización nuclear. Aumento 200X.

Para confirmar estos resultados en un tipo celular con capacidad adipogénica intrínseca, llevamos a cabo un abordaje de pérdida de función de AGPAT2 (usando un shRNA específico contra AGPAT2; shAGPAT2) en células MSC de donante sano inducidas a diferenciarse en presencia o ausencia de sobreexpresión de PPARg-1. Las células se infectaron con un vector lentiviral codificante del shAGPAT2 más eficiente (de cuatro versiones) que además codificaba para la GFP. Este abordaje, además, nos independizaba de los posibles efectos de la mutación AGPAT2 de nuestro paciente. En la figura 15 se observa cómo la diferenciación adipogénica está fuertemente inhibida en presencia del shAGPAT2 y cómo ésta se recupera a niveles normales en células que co-expresan el shAGPAT2 (demostrado por la fluorescencia de GFP) junto con PPARg-1 por transducción retroviral.

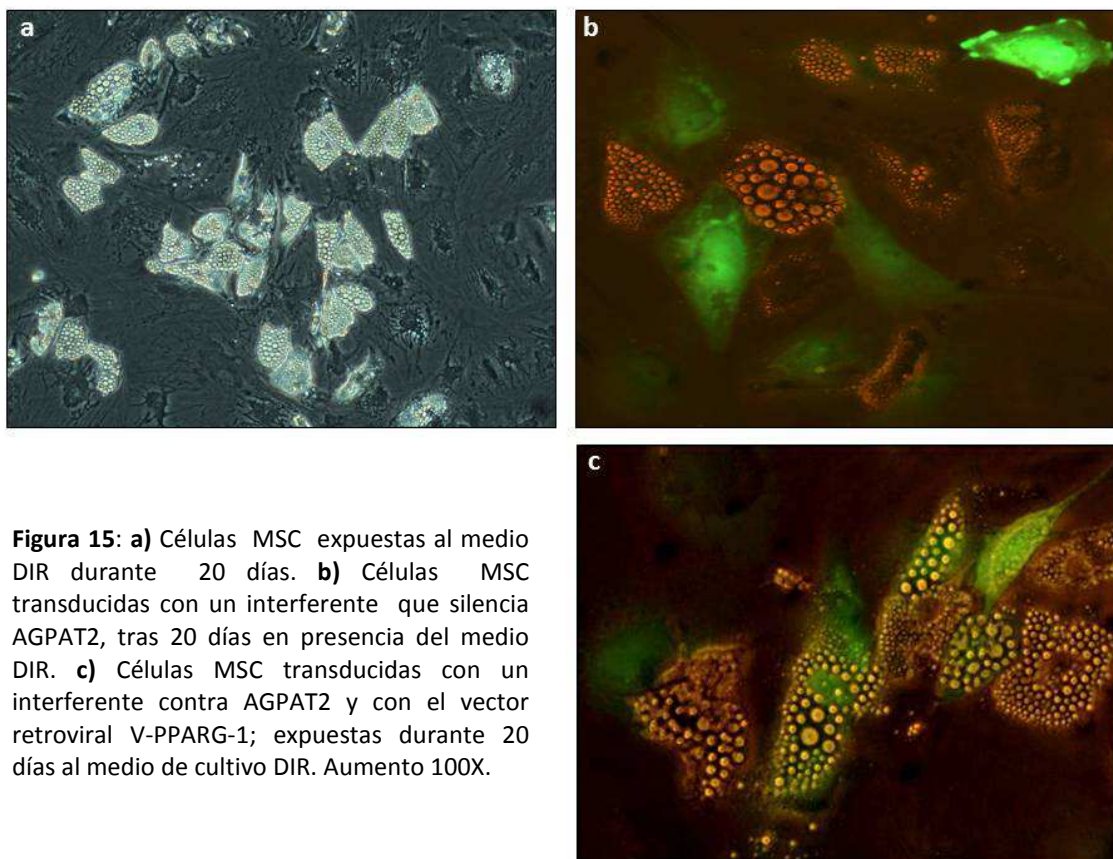


Figura 15: a) Células MSC expuestas al medio DIR durante 20 días. b) Células MSC transducidas con un interferente que silencia AGPAT2, tras 20 días en presencia del medio DIR. c) Células MSC transducidas con un interferente contra AGPAT2 y con el vector retroviral V-PPARG-1; expuestas durante 20 días al medio de cultivo DIR. Aumento 100X.

2.6. Redundancia funcional de la re-expresión de AGPAT2 en fibroblastos LD cotransducidos con el vector retroviral V-PPARG-1 y un vector lentiviral PGK-AGPAT2

A pesar de su capacidad observada de experimentar diferenciación adipogénica por sobreexpresión de PPARg, cabía esperar que el déficit de AGPAT2 funcional por mutación pudiera estar mermando el desarrollo del verdadero potencial adipogénico de los fibroblastos lipodistróficos LD. Con el propósito de determinar si la expresión de AGPAT2 funcional podría incrementar el potencial adipogénico de los LD transducidos con PPARg-1, diseñamos y construimos un vector lentiviral (PGK-AGPAT2) que codificaba para el cADN de AGPAT2 bajo el control del promotor de la fosfogliceratoquinasa (PGK), seguido de una secuencia IRES-GFP (Figura 16a). Con esta construcción viral se infectaron fibroblastos HF y LD que previamente habían sido transducidos con V-PPARG-1. La sobreexpresión de AGPAT2 en esas células se confirmó mediante Western-blot empleándose un anticuerpo anti-HA, que detectaba la proteína HA fusionada a AGPAT2 en el vector lentiviral (Figura 16b.). Al llegar a confluencia, el cultivo se puso en presencia del medio de diferenciación DIR durante 10 días. Del mismo modo, las células LD transducidas únicamente con el vector V-PPARG-1 se sembraron y expusieron al medio DIR. Al cabo de 10 días, no se observaron diferencias significativas entre el potencial adipogénico de los 2 cultivos (Figura 16c, d). Así, la cuantificación de las células

con vesículas lipídicas a día 10, fue del 50% en ambos casos (Figura 16e). Por otra parte, a los 7 días de la inducción de la diferenciación, el cultivo que había sido coinfectado con los vectores V-PPARg-1 y PGK-AGPAT2 presentaba una morfología consistente con la de células senescentes. Conforme avanzaba el tiempo de cultivo, este fenotipo se acentuaba observándose también un cierto grado de muerte celular. Por consiguiente, la coexpresión de AGPAT2 junto con PPARg-1 no parecía conferir a los fibroblastos dérmicos ninguna ventaja en cuanto a su capacidad de diferenciación adipogénica ni a su supervivencia respecto a la expresión exclusiva de PPARg-1. Estos resultados nos condujeron a continuar los experimentos con células HF y LD transducidas exclusivamente con el vector retroviral PPARg-1.

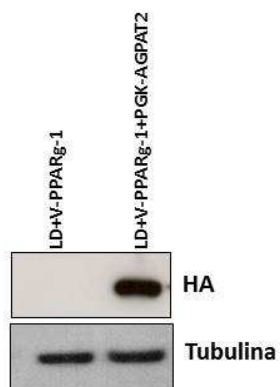
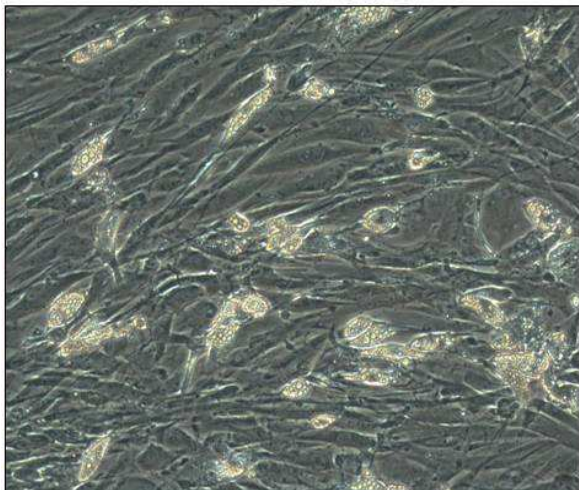
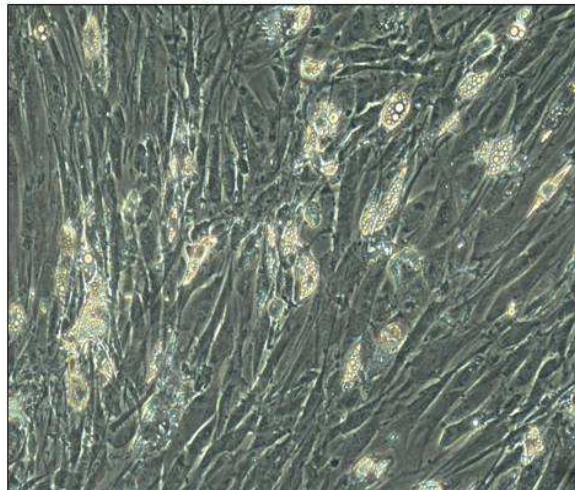
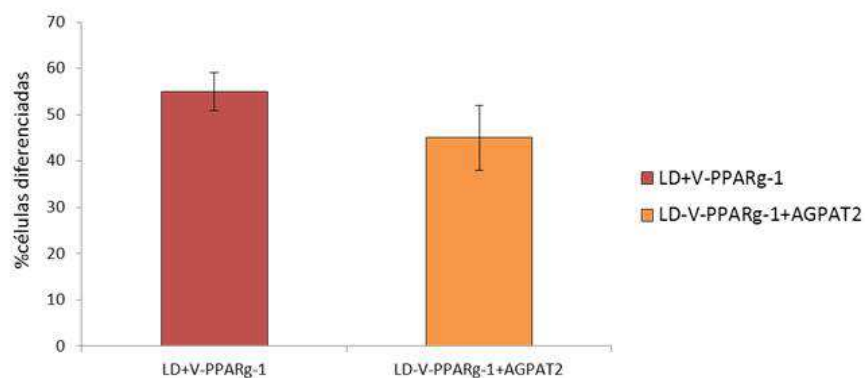
a**b****c****d****e**

Figura 16: **a)** Estructura del vector lentiviral empleado para sobreexpresar AGPAT2 en HF y LD. **b)** Western-blot con anticuerpo anti-HA en extractos de células LD transducidas con V-PPARg-1 y/o PGK-AGPAT2. **c-d)** Microfotografía de células LD transducidas únicamente con el vector VGIP-PPARg-1 (**c**) o con los vectores VGIP-PPARg-1 y PGK-AGPAT2 (**d**) y expuestas durante 10 días al medio de diferenciación DIR. Aumento 100X. **e)** Cuantificación del porcentaje de diferenciación celular.

2.7. Análisis de la expresión de factores de transcripción característicos del tejido adiposo en MSC; HF y LD que sobreexpresan PPARg-1

Una vez confirmada la capacidad de los fibroblastos control HF y lipodistróficos LD transducidos con V-PPARg-1 para sintetizar y acumular grasa, se llevó a cabo un análisis de expresión de marcadores de adipogénesis para caracterizar y confirmar el proceso a nivel molecular. Inicialmente, a modo de puesta a punto, se empleó el ARN de células MSC diferenciadas durante 12 días para realizar un estudio de expresión génica por RT-PCR. Se emplearon oligonucleótidos diseñados para detectar específicamente la expresión de los factores de transcripción aP2, C/EBP α y PPARg-2 característicos del proceso adipogénico. El análisis reveló la expresión de esos factores a días 3 y 12 de la diferenciación, pero no en células que no habían sido expuestas al medio DIR (Figura 17 a-c).

Al realizar este mismo experimento de expresión génica en células HF y LD, se observó que la expresión de aP2 y C/EBP α era significativamente mayor en células reprogramadas por V-PPARg-1, y aumentaba con el tiempo de exposición al medio de diferenciación DIR (Figura 18a, b). A pesar de la sobreexpresión de PPARg-1 exógeno, el empleo de oligonucleótidos cebadores específicos para PPARg-2 reveló, notablemente, una estricta regulación transcripcional (inducción) para esta isoforma observada sólo después de 3 y 12 días de diferenciación adipogénica de los fibroblastos HF y LD transducidos con V-PPARg-1, pero no en las células transducidas con el vector control (Figura 18c). Este experimento sugiere que la sobreexpresión de PPARg-1 actuaría como desencadenante de un estado propicio para la expresión de PPARg-2 y la adipogénesis concomitante en células cultivadas con el medio DIR aún en ausencia de AGPAT2. Además, el perfil de expresión de factores de transcripción de los HF y LD que sobreexpresan PPARg-1 parece ser equivalente al de las MSC.

2.8. Análisis de la expresión de adipoquinas en MSC; HF y LD que sobreexpresan PPARg-1

El análisis de los factores de transcripción se acompañó del estudio de la expresión de las 2 adipoquinas más importantes para la regulación metabólica mediada por el tejido adiposo: leptina y adiponectina. Al igual que en el experimento anterior, se comenzó con el análisis del ARN de las células MSC diferenciadas durante 12 días con el medio DIR. Se observó expresión de adiponectina a días 3 y 12, mientras que la leptina se expresaba muy levemente a día 3 y aumentaba notablemente a día 12 (Figura 17d, e). Paralelamente, se detectó la expresión de adiponectina en fibroblastos control HF y lipodistróficos LD infectados con V-PPARg-1, a tiempos 0, 3 y 12 post-adición del medio DIR, pero no se observó esto mismo en las células control no reprogramadas (Figura 18d). En cuanto a leptina, observamos altos niveles del ARNm de esta adipoquina a día 12 de la diferenciación en células transducidas con V-PPARg-1, mientras que a día 3 los niveles de ARNm eran apenas

perceptibles e indetectables a tiempo 0 (Figura 18e). En resumen, las células HF y LD reprogramadas y diferenciadas son capaces de expresar los factores de transcripción y las adipoquinas propios de los adipocitos maduros, de manera análoga a como lo hacen las MSC diferenciadas.

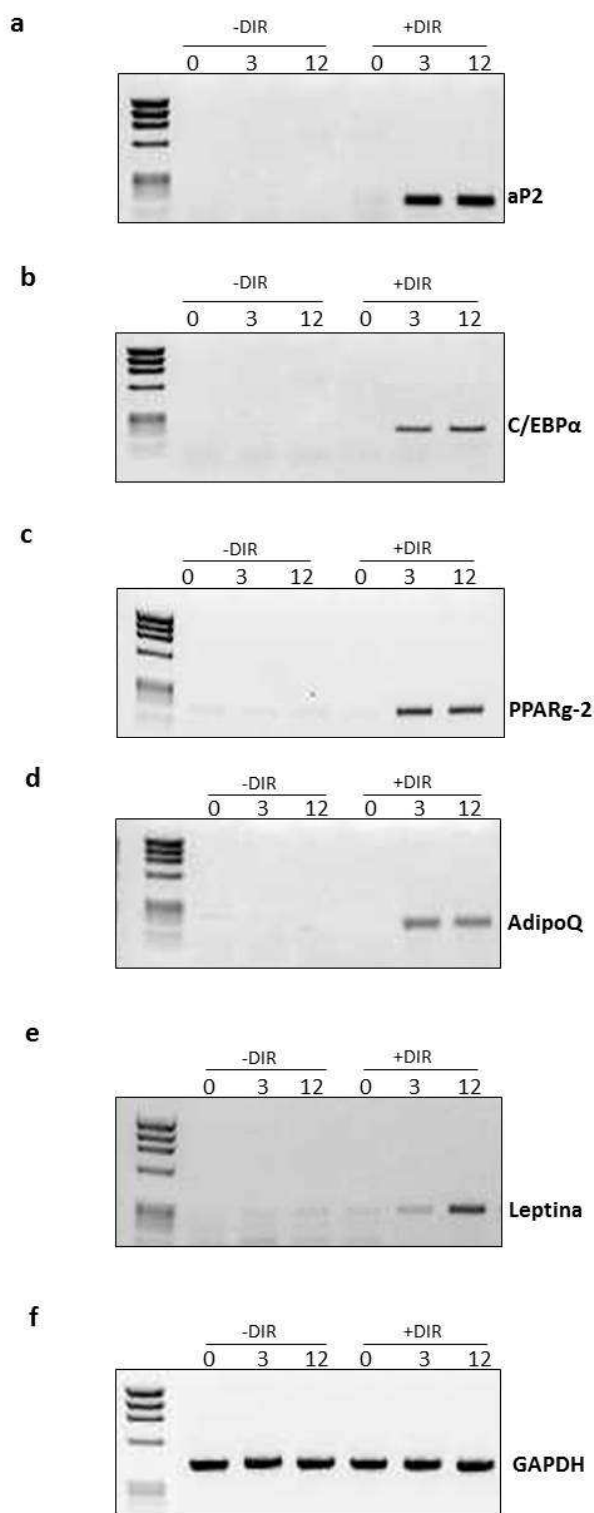


Figura 17: Análisis por RT-PCR de células MSC a 0, 3 y 12 días de diferenciación adipogénica. Se utilizaron oligonucleótidos para detectar la expresión de los factores de transcripción aP2 (a), C/EBPα (b), PPARγ-2 (c) y de las adipoquinas adiponectina (d) y leptina (e). El gen constitutivo GAPDH (f) fue empleado como control de carga.

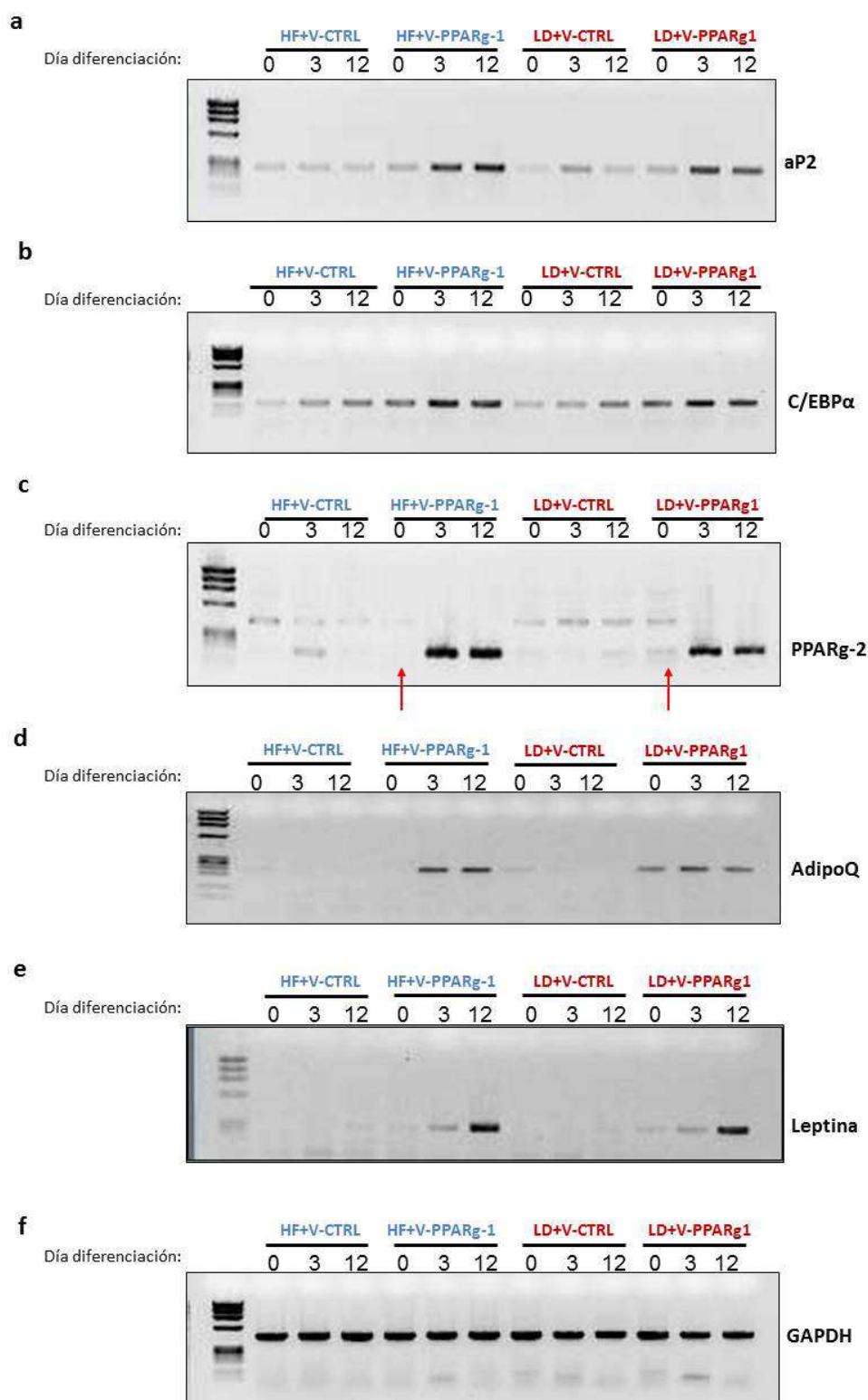


Figura 18: Análisis por RT-PCR de células HF y LD transducidas con V-CTRL o V-PPAR γ -1 a 0, 3 y 12 días de diferenciación adipogénica. Se utilizaron oligonucleótidos para detectar la expresión de los factores de transcripción aP2 (a), C/EBP α (b), PPAR γ -2 (c) y de las adipocinas adiponectina (d) y leptina (e). El gen constitutivo GAPDH (f) fue empleado como control de carga. Las flechas rojas resaltan la ausencia de expresión endógena de PPAR γ -2.

2.8.1. Determinación de los niveles de leptina humana secretada al medio de cultivo por HF y LD transducidos con PPARg-1 y sometidos a diferenciación adipogénica

Para determinar si los resultados obtenidos a nivel de ARNm se reflejaban a nivel proteico empleamos un kit comercial de ELISA específico para leptina humana. El análisis permitió detectar la presencia de esta adipoquina en el medio de cultivo de fibroblastos HF y LD reprogramados y expuestos durante 30 días al medio DIR. La concentración de leptina humana en el medio de cultivo de los HF era de $2.6\text{ng}/24\text{h} \cdot 10^6$ células y de $1.6\text{ng}/24\text{h} \cdot 10^6$ células en el de los LD. Las células control presentaban niveles de leptina por debajo de los $0.2\text{ng}/\text{ml}$ (Figura 19). Por tanto, los adipocitos derivados de las células dérmicas de controles sanos y de pacientes de LCG son capaces de sintetizar leptina y liberarla al medio de cultivo.

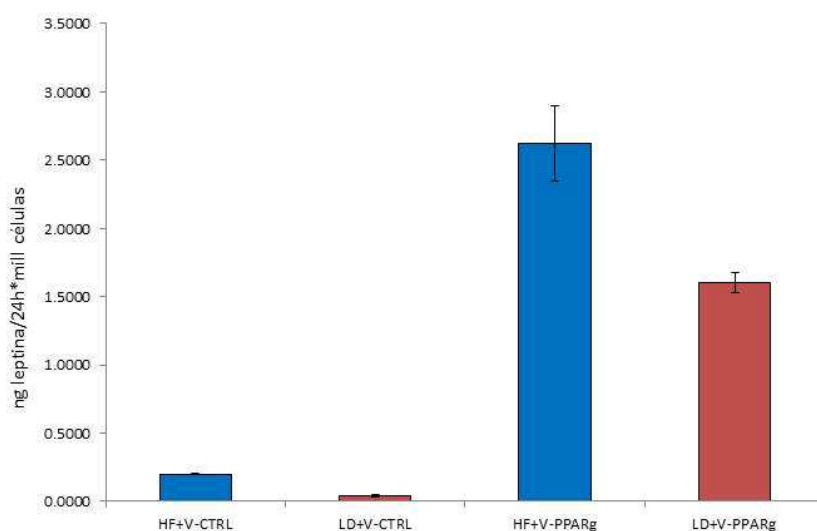


Figura 19: Ensayo ELISA para la cuantificación de la leptina sintetizada y secretada al medio por HF y LD transducidos con el vector V-CTRL o V-PPARg-1 y expuestas al medio de diferenciación DIR durante 1 mes.

2. 9. Diferenciación adipocítica terminal de HF y LD reprogramados por PPARg-1

Quisimos estudiar si la diferenciación era capaz de llegar a estadios muy avanzados. Para ello analizamos otro parámetro de diferenciación terminal de las células como es la formación de vesículas lipídicas uniloculares. En condiciones fisiológicas, los adipocitos contienen múltiples gotas lipídicas que durante el proceso de diferenciación van fusionándose unas con otras para dar lugar a una gran vesícula unilocular que ocupa casi la totalidad del citoplasma. Para determinar si esto sucedía en nuestras células *in vitro*, se expuso a los HF y LD reprogramados con V-PPARg-1 al medio de cultivo DIR durante 30 días. Aunque durante los primeros 17 días se observaban únicamente células con vesículas multiloculares, a partir de ese día empezaron a apreciarse las primeras células univacuoladas. Conforme avanzaba el tiempo aumentó el porcentaje de estas células, hasta llegar al

día 30, en el que más del 90% de las células diferenciadas contenía una sola gota lipídica en su citoplasma (Figura 20). Esto se observó tanto en HF como en LD que sobreexpresaban PPARg-1, pero no en las células control.

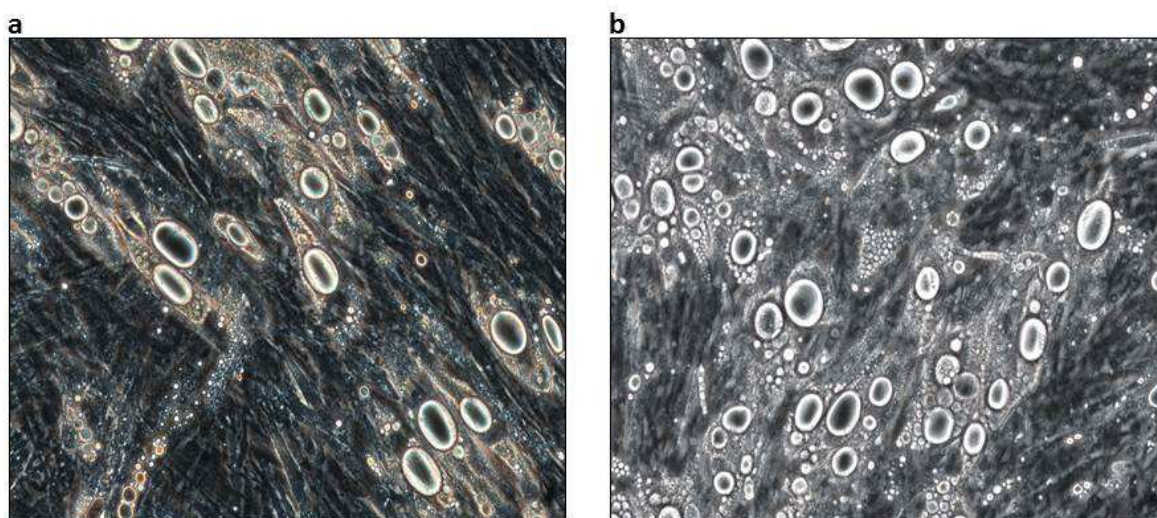


Figura 20: Microscopía de contraste de fases de HF (a) y LD (b) transducidos con V-PPARg-1 tras 1 mes de diferenciación adipogénica. Se aprecia la formación de vesículas uniloculares característica de la diferenciación fisiológica de preadipocitos humanos. Aumento 200X.

2.10. Estudio mediante RT-PCR de la expresión de diferentes isoformas de AGPAT en MSC; HF y LD transducidos con PPARG-1

Una vez confirmada la diferenciación terminal de los adipocitos derivados de los fibroblastos dérmicos, nos planteamos estudiar la posible compensación enzimática que se podría estar dando por parte de alguna de las isoformas de AGPAT en las células lipodistróficas LD que sobreexpresaban PPARg-1, ya que esto podría explicar la capacidad de esas células para sintetizar ácido fosfatídico en ausencia de AGPAT2. Mediante RT-PCR se analizó la expresión de algunas isoformas de AGPAT en las células MSC, HF y LD. Se diseñaron oligonucleótidos que detectasen específicamente las isoformas 1, 2, 3 y 6. AGPAT1 es una enzima que se expresa de forma ubicua en la mayoría de los tejidos mientras que AGPAT2 es específica del tejido adiposo (Agarwal et al., 2011). AGPAT3 se expresa en varios tejidos, predominando en el músculo esquelético, intestino delgado y ovario (Prasad et al., 2011); y AGPAT6 es característica del epitelio mamario y del tejido adiposo marrón (Chen et al., 2008b). Al igual que en los experimentos de análisis de expresión de factores de transcripción, inicialmente, se realizó el ensayo con ARN de células MSC diferenciadas extraído a días 0, 3, 7 y 12 desde la adición del medio DIR. Como se aprecia en la figura 21a, se observó expresión de AGPAT1 a días 0 y 3, pero no a días 7 y 12. Por otro lado, AGPAT2 se expresaba a todos los tiempos del proceso de diferenciación y los niveles máximos se alcanzaban a día 12, en la diferenciación terminal. A medida que avanza la diferenciación, AGPAT1 parece dejar de expresarse para ser reemplazada por

AGPAT2, la isoforma más específica del tejido graso. No se detectó ARN de las isoformas 3 y 6 de AGPAT (Figura 21b). Posteriormente, se llevó a cabo este ensayo en fibroblastos HF y LD reprogramados con V-PPAR γ -1 y expuestos durante 0, 3 y 12 días al medio DIR. En esta ocasión, no se observó expresión de AGPAT1 a ningún tiempo (Figura 22a) pero sí se observó expresión del ARNm de AGPAT2, tanto en HF como en LD, siendo mayor esta expresión en las células que sobreexpresaban PPAR γ -1 (Figura 22b). Al igual que en el primer experimento, no se apreció expresión de AGPAT 3 ni 6 (datos no mostrados). De estos experimentos se puede deducir que no parece existir una compensación enzimática por parte de la familia de enzimas AGPAT que permita suplir el déficit en AGPAT2 que se da en la LCG tipo 1. Sin embargo, puesto que el ácido fosfatídico es necesario para la síntesis de los triglicéridos y glicerofosfolípidos, debe existir una actividad enzimática adicional que conduce a la formación de dicho compuesto.

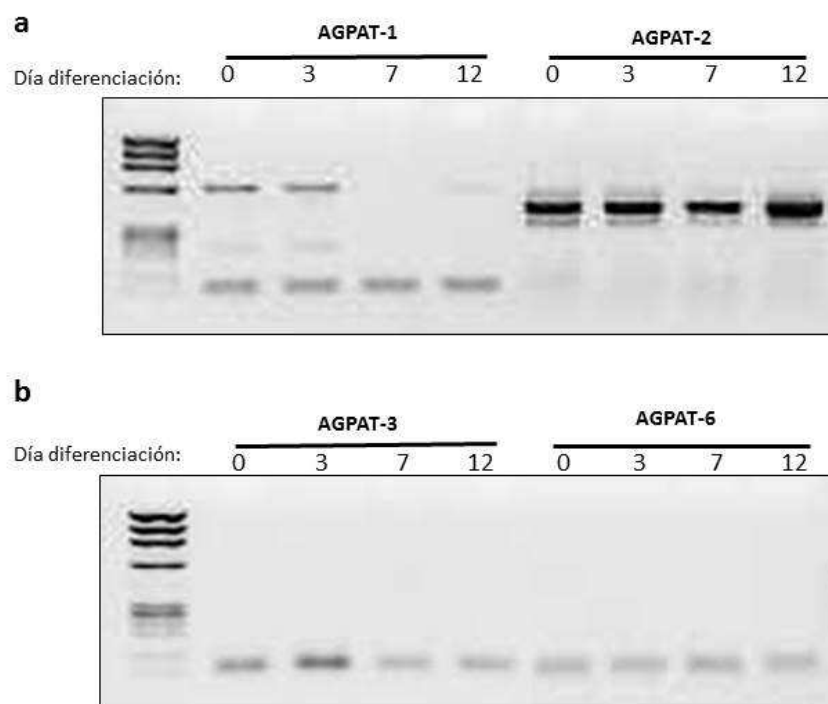


Figura 21: Análisis de la expresión del ARN de las isoformas 1, 2, 3 y 6 de AGPAT mediante RT-PCR realizadas a partir del cADN de MSCs a días 0, 3, 7 y 12 tras la inducción de la diferenciación adipogénica.

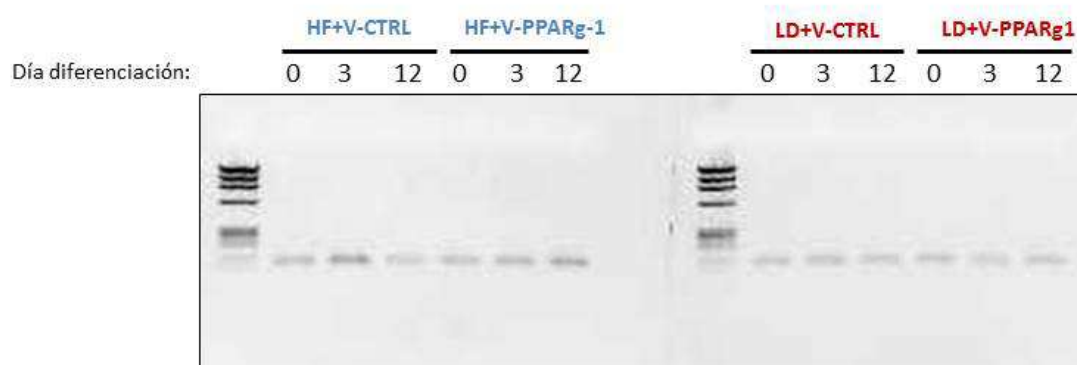
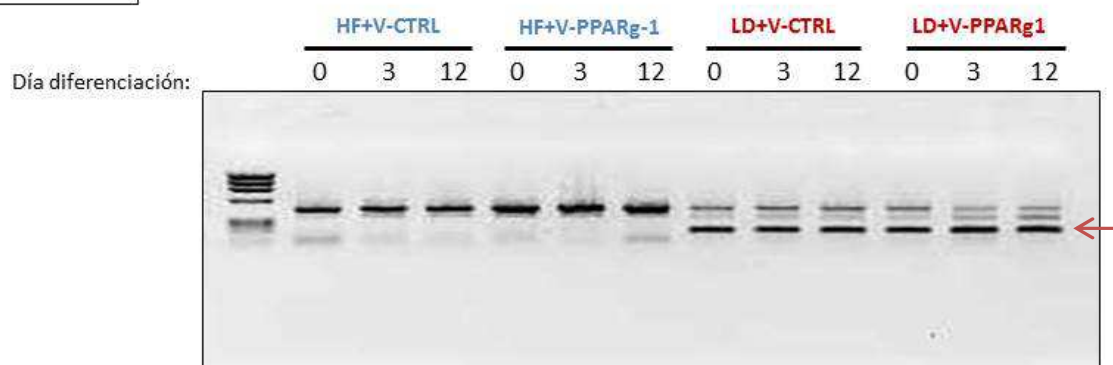
a)AGPAT-1**b)AGPAT-2**

Figura 22: Análisis de la expresión del ARN de las isoformas 1 (a) y 2 (b) de AGPAT mediante RT-PCR a partir del cADN de HF y LD transducidos con los vectores V-CTRL o V-PPARg-1 a días 0, 3 y 12 tras la inducción de la diferenciación adipogénica. La banda de menor tamaño (flecha) corresponde al transcrito del alelo que ha perdido los exones 3 y 4.

2.11. Análisis de la señalización mediada por Akt en cultivos de HF y LD transducidos con V-PPARg-1

La estrecha relación y el solapamiento existente entre las vías de señalización de leptina e insulina han conducido de forma inevitable al estudio de la regulación de ambas en la LCG, una enfermedad en la que la ausencia de leptina es el principal factor desencadenante de importantes trastornos metabólicos. La proteína Akt es una molécula clave en la vía de señalización de la insulina y está implicada en un alto número de procesos celulares, por lo que algunos autores han estudiado su capacidad de activación en células procedentes de pacientes lipodistróficos. En 2012, Burant y cols. observaron que las células con mutaciones en AGPAT2 presentaban una reducción de la activación de Akt (Subauste et al., 2012), lo que nos condujo a estudiar si dicho fenómeno sucedía en las células LD que habían sido empleadas en los experimentos de este trabajo de tesis. Para ello, se prepararon extractos proteicos de células control HF y lipodistróficas LD transducidas con V-CTRL o V-PPARg-1. Las células se sometieron a ayuno de suero de 48 horas y, un grupo fue incubado con insulina

durante 30 minutos con el objeto de inducir la activación de Akt. Los extractos de proteínas se analizaron mediante western-blot con anticuerpos anti fosfoAkt, forma activa de Akt, y anti Akt total. Como muestra la figura 23, se detectó proteína pAkt en las células tratadas con insulina. Los niveles eran idénticos en las células de paciente LD y las de donante sano HF. Además, no se observaban diferencias entre las células transducidas con el vector V-CTRL y V-PPARg-1, indicando que esta activación ocurría en las células como consecuencia de la presencia de insulina, sin necesidad de la sobreexpresión de PPARg-1 ni AGPAT2 (Figura 23a). Al realizar el revelado con un anticuerpo anti-Akt total, se puso de manifiesto que los niveles totales de esta proteína eran similares en todas las muestras proteicas (Figura 23b). Por lo tanto, se pudo concluir que las células de paciente estudiadas en estos ensayos no presentaban niveles disminuidos de Akt ni reducción de su capacidad de activación, a pesar de presentar mutaciones en AGPAT2. Estos resultados no concuerdan con los hallados por Burant y cols. , que detectaban niveles disminuidos de pAkt en células de pacientes de LCG tipo 1.

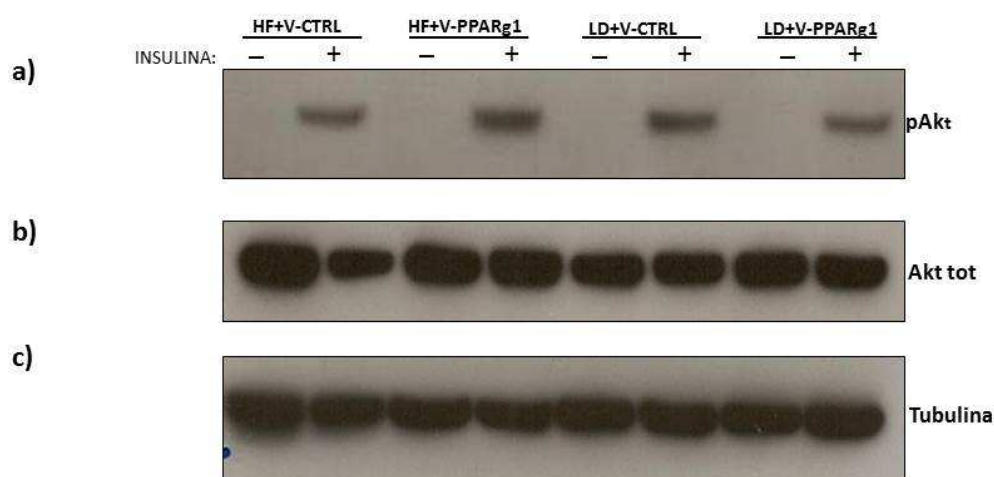


Figura 23: Análisis de la expresión de pAkt (a) y Akt total (b) mediante Western-blot en extractos proteicos de HF y LD transducidos con V-CTRL o V-PPARg-1, en ausencia y presencia de activación por insulina durante 30 minutos. La detección de tubulina (c) se realiza como control de carga.

2. 12. Perfil lipídico de células adiposas derivadas de MSC; HF y LD transducidos con PPARg-1

Para determinar si la grasa sintetizada por las células lipodistróficas LD diferenciadas era equivalente a la generada por los adipocitos maduros, se llevaron a cabo diversos experimentos encaminados a determinar el perfil lipídico de estas células. Empleando el método Folch, se extrajeron los lípidos presentes en células MSC, HF y LD transducidas con V-PPARg-1 y diferenciadas durante 12 días. A continuación, se cuantificaron los fosfolípidos (PL) mediante adición de ácido perclórico e hidrólisis. Mediante el uso de kits comerciales se cuantificaron también los triglicéridos (TG) y el colesterol

(COL) sintetizados por estas células. En la Tabla 3 aparecen recogidos los datos obtenidos, donde se ha normalizado la cantidad de cada lípido refiriéndolo como μg fosfolípido/nº células diferenciadas. Esto se realizó debido a que el porcentaje de diferenciación varía entre los 3 tipos celulares, por lo que al realizar la normalización se estarían evitando las variaciones debidas a las distintas eficiencias de diferenciación y de transducción del vector V-PPARg-1. Los 3 tipos de células presentaban una mayor cantidad de PL que de TG y COL. Además, una vez realizada la normalización, se obtenían cantidades idénticas de PL. Las cantidades de TG y COL también eran del mismo orden de magnitud entre los diferentes tipos celulares. Gracias a este experimento se confirmó lo que anteriormente había indicado la tinción con el colorante *Oil Red O*, y es que el contenido de las vesículas presentes en estas células es principalmente debido a lípidos neutros. Por otro lado, se puso de manifiesto cómo las células LD reprogramadas eran capaces de generar una grasa de composición muy similar a la que sintetizan las MSC o los fibroblastos control HF reprogramados, indicando que la adipogénesis que experimentan, en cuanto a su perfil lipídico, es comparable a la de dichas células.

Muestra	Nº células	% Diferenciación	PL *	TG *	COL *
MSC	1.650.000	50%	2.2e-4	4.1e-5	3e-5
HF+V-PPARg-1	960.000	60%	2.5e-4	2.4e-5	4.3e-5
LD+V-PPARg-1	826.000	40%	2.2e-4	2.7e-5	1.3e-5

Tabla 3: Datos del experimento de cuantificación de fosfolípidos (PL), triglicéridos (TG) y colesterol (COL) en los extractos lipídicos obtenidos a partir de MSC, HF y LD transducidos con V-PPARg-1 tras 12 días de diferenciación adipogénica. *: los datos se muestran como μg fosfolípido/nº células diferenciadas.

2.12.1. Identificación de las diferentes clases de fosfolípidos presentes en los extractos lipídicos de MSC; HF y LD transducidos con PPARg-1 y diferenciados a grasa

Habiéndose determinado que las células LD transducidas con PPARg-1 y diferenciadas contenían las mismas cantidades de PL que las MSC y HF, se procedió a analizar si los PL presentes en esos 3 tipos celulares eran también equivalentes desde un punto de vista cualitativo. Para ello, se llevó a cabo la separación de las diferentes especies mediante cromatografía de capa fina. Se aplicaron en la membrana de sílice muestras de los extractos lipídicos de las 3 clases celulares, y se emplearon diferentes patrones de lípidos como referencias. Tras el revelado de la placa se pudo comprobar la presencia de 7 tipos de PL en estas muestras: lisofosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y cardiolipina (Figura 24). Después, cada

banda correspondiente a un subtipo de PL fue aislada para proceder a su cuantificación. Se realizó de la misma manera que la cuantificación de los fosfolípidos totales. En la gráfica de la figura 25 se representan las cantidades relativas de cada uno de los PL detectados en las muestras. Los porcentajes de cada PL no presentaban diferencias significativas entre los distintos tipos celulares, a excepción de la LPC, que aparecía disminuida en HF. Este ensayo determinó, por tanto, que la composición de PL de las MSC, HF y LD era muy similar tanto desde un punto de vista cualitativo como cuantitativo.

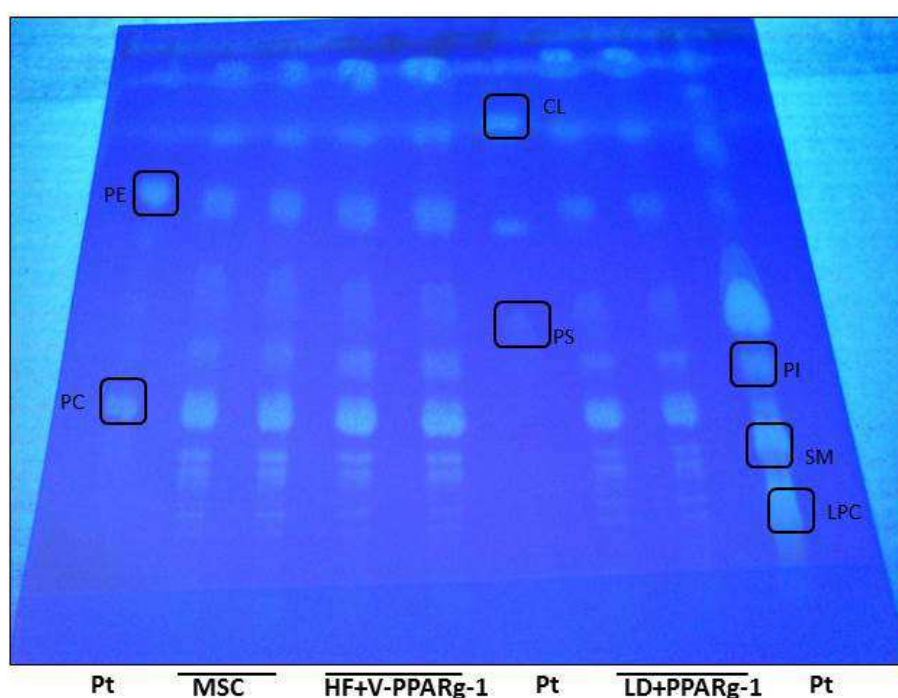


Figura 24: Separación mediante cromatografía de capa fina de las diferentes clases de fosfolípidos presentes en los extractos lipídicos de MSC, HF y LD transducidos con V-PPARg-1 y sometidos a 12 días de diferenciación adipogénica. Los carriles nombrados como Pt corresponden a los lípidos patrón aplicados a la membrana y usados como referencia. Fuimos capaces de detectar 7 tipos de fosfolípidos: **LPC**: lisofosfatidilcolina ; **SM**: esfingomielina; **PC**: fosfatidilcolina; **PI**: fosfatidilinositol; **PS**: fosfatidilserina; **PE**: fosfatidiletanolamina; **CL**: cardiolipina

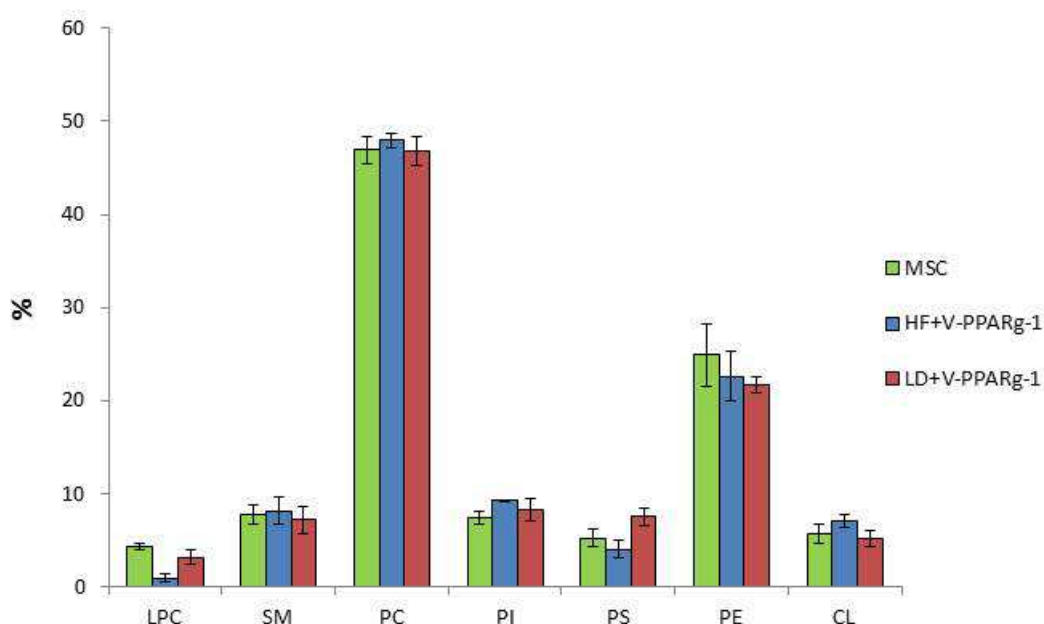


Figura 25: Representación de la cantidad relativa de cada tipo de fosfolípido identificado en la cromatografía de capa fina realizada a partir de los extractos lipídicos de MSC, HF y LD transducidos con V-PPARg-1 y sometidos a 12 días de diferenciación adipogénica. **LPC:** lisofosfatidilcolina ; **SM:** esfingomielina; **PC:** fosfatidilcolina; **PI:** fosfatidilinositol; **PS:** fosfatidilserina; **PE:** fosfatidiletanolamina; **CL:** cardiolipina

2.12.2. Identificación mediante espectrometría de masas de diferentes especies de TG en extractos lipídicos de MSC; HF y LD transducidos con PPARg-1 y sometidos a diferenciación adipogénica

Al igual que se hizo en el análisis de los PL, una vez demostrado que las cantidades de TG eran muy parecidas en las 3 muestras lipídicas (MSC, HF y LD) (Tabla 3), nos propusimos comprobar si éstas eran cualitativamente similares. La espectrometría de masas realizada con los extractos de las células diferenciadas dio lugar a un espectro cuyo análisis reveló la existencia de TG comunes a los 3 tipos celulares. En las tablas 4, 5 y 6 se muestran las especies identificadas en MSC, HF y LD respectivamente. Puede observarse que las especies de TG C48:2, C50:2 y C52:2 eran comunes a las 3 clases de células. Además, se encontraron varios TG comunes a las MSC y LD, como eran: C52:3, C54:2 y C54:3. Las especies C50:3 y C52:1 se detectaron en MSC y HF. Este estudio demostró que, aunque existía cierta variación entre los TG sintetizados por MSC, HF y LD, todos los tipos celulares analizados, incluso los de paciente con LCG reprogramados (LD), eran capaces de sintetizar TG conteniendo especies comunes (ácidos grasos de la misma longitud y saturación). Las variaciones observadas entre especies de TG en las distintas células podrían ser consecuencia de las diferentes actividades enzimáticas encargadas de la síntesis del ácido fosfatídico en cada tipo celular, a partir del cual se generan los TG. Cada enzima tiene una afinidad máxima por un sustrato determinado,

por lo que el ácido graso empleado para la síntesis del ácido fosfatídico variaría en cada caso, generándose diferentes especies que finalmente darán lugar a distintos tipos de TG.

MSC

$[M+NH_4]^+$ m/z	$[M+Na]^+$ m/z	TG	Ácidos grasos		
820	825	C 48:2	16:0	16:1	16:1
			14:0	16:1	18:1
822	827	C 48:1	16:0	16:0	16:1
846	851	C 50:3	16:0	16:1	18:2
848	853	C 50:2	16:0	16:1	18:1
			16:0	16:0	18:2
874	879	C 52:3	16:1	18:1	18:1
			16:0	18:1	18:2
876	881	C 52:2	16:0	18:1	18:1
878	883	C 52:1	16:0	18:0	18:1
902	907	C 54:3	18:1	18:1	18:1
904	909	C 54:2	18:0	18:1	18:1

Tabla 4**HF+PPARG-1**

$[M+NH_4]^+$ m/z	$[M+Na]^+$ m/z	TG	Ácidos grasos		
820	825	C 48:2	16:0	16:1	16:1
			14:0	16:1	18:1
846	851	C 50:3	16:0	16:1	18:2
848	853	C 50:2	16:0	16:1	18:1
			16:0	16:0	18:2
876	881	C 52:2	16:0	18:1	18:1
878	883	C 52:1	16:0	18:0	18:1

Tabla 5**LD+PPARG-1**

$[M+NH_4]^+$ m/z	$[M+Na]^+$ m/z	TG	Ácidos grasos		
820	825	C 48:2	16:0	16:1	16:1
			14:0	16:1	18:1
848	853	C 50:2	16:0	16:1	18:1
			16:0	16:0	18:2
874	879	C 52:3	16:1	18:1	18:1
			16:0	18:1	18:2
876	881	C 52:2	16:0	18:1	18:1
896	901	C 54:6	18:1	18:2	18:3
			18:2	18:2	18:2
902	907	C 54:3	18:1	18:1	18:1
904	909	C 54:2	18:0	18:1	18:1

Tabla 6

Tablas 4, 5 y 6: Identificación mediante espectrometría de masas de las cadenas laterales de ácidos grasos de los triglicéridos en los extractos lipídicos de MSC, HF y LD transducidos con V-PPARG-1 y sometidos a 12 días de diferenciación adipogénica

3. Estudios *in vitro* en células CGL tipo 2

3. 1. Caracterización del potencial adipogénico de fibroblastos de un paciente de LCG tipo 2 (LD2)

A lo largo del desarrollo de esta tesis doctoral, pudimos acceder a fibroblastos dérmicos procedentes de una biopsia de piel de un paciente de LCG tipo 2 (LD2). Este subtipo de lipodistrofia se produce por mutaciones en el gen BSCL2, que codifica para la proteína seipina. Aunque la función exacta de esta proteína se desconoce, su función es necesaria para que se produzca correctamente la diferenciación terminal de los adipocitos (Garg and Agarwal, 2009). Quisimos determinar si la estrategia empleada para la corrección de las células LD (LCG tipo1) era válida para la regeneración de grasa funcional en esta variedad de la enfermedad. Del mismo modo que ocurría con los LD

(Figura 9e-h), los fibroblastos LD2 no modificados genéticamente no eran capaces de generar vesículas lipídicas al estar expuestos al medio de diferenciación DIR (imágenes no mostradas). Esos fibroblastos fueron entonces reprogramados con el vector V-PPAR γ -1 y, al llegar a confluencia, se les añadió el medio DIR. De manera análoga a lo que sucedía con los fibroblastos LD, a día 3 desde la adición del medio se observaron las primeras células diferenciadas y a día 10 se alcanzaba el máximo de la diferenciación adipogénica. Las células presentaban múltiples vesículas redondeadas, multiloculares y refringentes. El porcentaje medio de diferenciación de estas células fue de un 65% (Figura 26a). Se obtuvo una tinción positiva para *Oil Red O* que confirmaba el contenido lipídico de las vesículas formadas en las células LD2 (Figura 26b). Ninguno de estos resultados se obtuvo cuando los fibroblastos LD2 fueron transducidos con el vector V-CTRL. De esta forma se pudo concluir que las células LD2, al ser forzadas a expresar PPAR γ -1, también adquirirían la capacidad de experimentar diferenciación adipogénica en presencia del medio de cultivo DIR. Este hallazgo se consideró relevante, ya que el empleo de una misma metodología consiguió superar el defecto metabólico presente en células de pacientes con errores genéticos diferentes, lo que plantearía la posibilidad de utilizar una misma aproximación celular/molecular para la corrección de distintos subtipos de LCG.

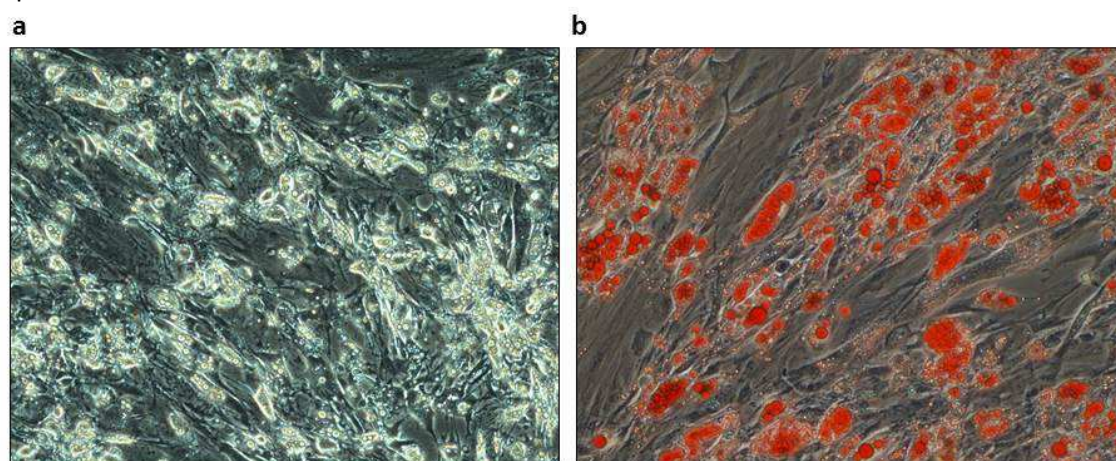


Figura 26: Microscopía de contraste de fases de LD (BSCL2 $-/-$) transducidos con VGIP-PPAR γ -1 tras 10 días en presencia del medio de diferenciación DIR, antes (a) y después (b) de realizar la tinción con el colorante *Oil Red O*. Aumento 100X.

3.2. Análisis de la expresión de factores de transcripción característicos del tejido adiposo en LD2 transducidos con PPAR γ -1

Con el objetivo de completar la caracterización funcional de las células adiposas derivadas de los fibroblastos lipodistróficos LD2, se decidió analizar la expresión de marcadores adipogénicos tal como se hizo anteriormente en células LD (Figura 18), por considerarse que ese ensayo fue el que aportó mayor información sobre la diferenciación de las células reprogramadas. La RT-PCR realizada

a partir del ARN de LD2 transducidos con V-PPAR γ -1 y diferenciados, extraído a días 0, 3 y 12, empleando oligonucleótidos diseñados para detectar específicamente los factores de transcripción aP2, C/EBP α y PPAR γ -2 reprodujo el patrón de expresión observado en las células LD. Así, se detectó la expresión de aP2 y C/EBP α , a niveles significativamente mayores en células infectadas con V-PPAR γ -1, y su aumento con el tiempo de exposición al medio de diferenciación DIR (Figura 27a, b). También se detectó PPAR γ -2 a tiempos 3 y 12 en LD2 reprogramados, pero no en las células control. De nuevo se ponía de manifiesto la fuerte regulación transcripcional a la que parece estar sometido PPAR γ -2, el cual no es detectado hasta que PPAR γ -1 se sobreexpresa en las células. (Figura 27c). Este experimento demuestra la capacidad de los fibroblastos LD2 transducidos con PPAR γ -1 para diferenciar a células adiposas que expresan los factores de transcripción característicos de los adipocitos maduros.

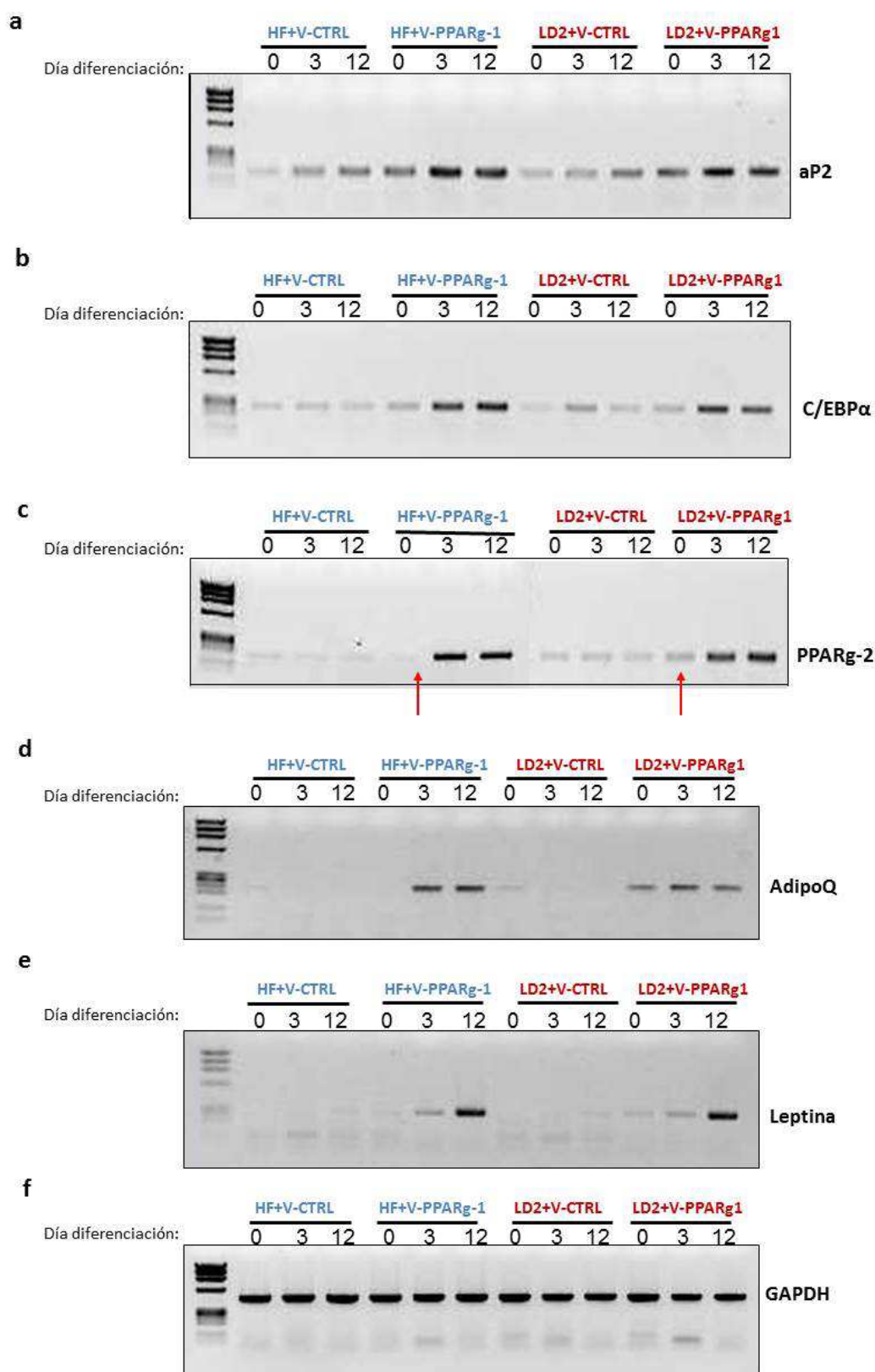


Figura 27: RT-PCRs realizadas con ARN de células HF y LD (BSCL2 $^{-/-}$) transducidas con V-CTRL o V-PPAR γ -1 a días 0, 3 y 12 de la diferenciación adipogénica. Se utilizaron oligonucleótidos para detectar la expresión de los factores de transcripción aP2 (a), C/EBP α (b), PPAR γ -2 (c) y de las adipoquinas adiponectina (d) y leptina (e). El gen constitutivo GAPDH (f) fue empleado como control de carga. Las flechas rojas resaltan la ausencia de expresión endógena de PPAR γ -2.

3.3. Análisis de la expresión de adipoquinas en células LD2 que sobreexpresan PPARg-1

Siguiendo la línea de experimentos encaminados a confirmar la madurez de los adipocitos obtenidos a partir de las células LD2, se procedió al estudio de la expresión de las adipoquinas leptina y adiponectina. Empleando el ARN de los fibroblastos LD2 transducidos con PPARg-1 y expuestos al medio DIR, se realizaron RT-PCRs específicas para esas dos adipoquinas. Se observó expresión de adiponectina en los LD2 infectados con V-PPARg-1, a 0, 3 y 12 días tras la adición del medio DIR, lo cual no sucedía en las células control (Figura 27d). Por otra parte, se producía una elevada expresión de leptina a día 12 de la diferenciación en células reprogramadas, mientras que a día 3 era muy baja e indetectable a tiempo 0 (Figura 27e). Por tanto, los fibroblastos LD2 reprogramados eran capaces de expresar las adipoquinas propias de los adipocitos diferenciados terminalmente y seguían el mismo patrón de expresión que los HF y los LD (LCG tipo 1).

3.4. Análisis de la señalización mediada por Akt en cultivos de LD2 transducidos con PPARg-1

El estudio de activación y expresión de Akt se llevó a cabo también en las células LD2, para comprobar el correcto funcionamiento de esa vía en esta variedad de la enfermedad. Al igual que en el apartado 2.11, este experimento se realizó mediante western-blot. Las células LD2 fueron transducidas con V-CTRL o V-PPARg-1 y, a continuación, se sometieron a un ayuno de 48 horas después del cual se incubó un grupo con insulina durante 30 minutos. En el ensayo se utilizaron anticuerpos anti-pAkt y anti-Akt total. La forma fosforilada de Akt fue detectada, como anticipábamos, únicamente en las células tratadas con insulina. No se apreciaron diferencias significativas en la expresión de pAkt entre las células infectadas con V-CTRL respecto a las infectadas con V-PPARg-1 (Figura 28a). Tampoco se observaron variaciones en los niveles de Akt total entre unas células y otras (Figura 28b). Por consiguiente, de nuevo se demostró la ausencia de alteraciones en la activación y expresión de Akt en células de paciente con LCG de tipo 2.

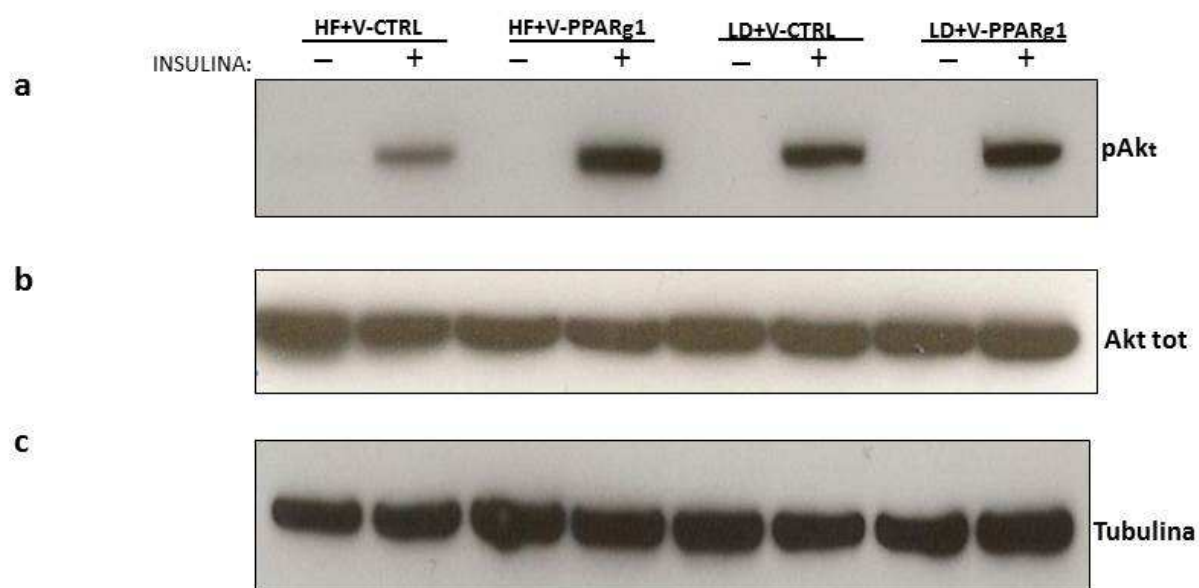


Figura 28: Detección de la expresión de pAkt y Akt total mediante Western-blot en extractos proteicos de HF y LD (BSCL2^{-/-}) transducidos con V-CTRL o V-PPAR_g-1, en ausencia y presencia de activación por insulina durante 30 minutos. La detección de tubulina se realiza como control de carga.

4. Estudios *in vivo*

Una vez realizada la caracterización *in vitro* de los fibroblastos dérmicos de paciente reprogramados por PPAR_g-1 y diferenciados a adipocitos, nos propusimos explorar la posibilidad de que estas células conservaran su potencial adipogénico *in vivo*. Su capacidad de almacenar triglicéridos provocando la consiguiente disminución de la hipertrigliceridemia y de sintetizar adipoquinas, podría ser usada como una aproximación terapéutica para controlar y corregir los graves defectos metabólicos presentes en la LCG.

Los experimentos *in vivo* se llevaron a cabo mediante 2 estrategias de trasplante de células reprogramadas formando parte de sistemas organotípicos tridimensionales.

4.1. Trasplante subcutáneo

En una primera aproximación quisimos estudiar la persistencia y los posibles efectos adversos (tumorigenicidad, diferenciación aberrante) de los fibroblastos de donante reprogramados implantados en ratones inmunodeficientes receptores. Para ello, en primer lugar modificamos las células para que expresaran la proteína verde fluorescente GFP mediante transducción con un vector lentiviral y, a continuación, las reprogramamos con el vector V-PPAR_g-1. Las células reprogramadas positivas para GFP (>80%) fueron embebidas en una matriz de fibrina e implantadas subcutáneamente en el lomo de ratones nu/nu, (Figura 29a). Al cabo de cuatro semanas, los ratones

fueron epi-iluminados con luz azul (495nm) sobre las zonas trasplantadas. Pudimos observar fluorescencia verde, indicativa de la presencia de células trasplantadas (Figura 30) en 5 de los 6 animales trasplantados. El análisis histopatológico de las zonas fluorescentes subcutáneas no reveló ningún signo de malignidad ni de diferenciación aberrante por parte de estos fibroblastos reprogramados (resultados no mostrados).

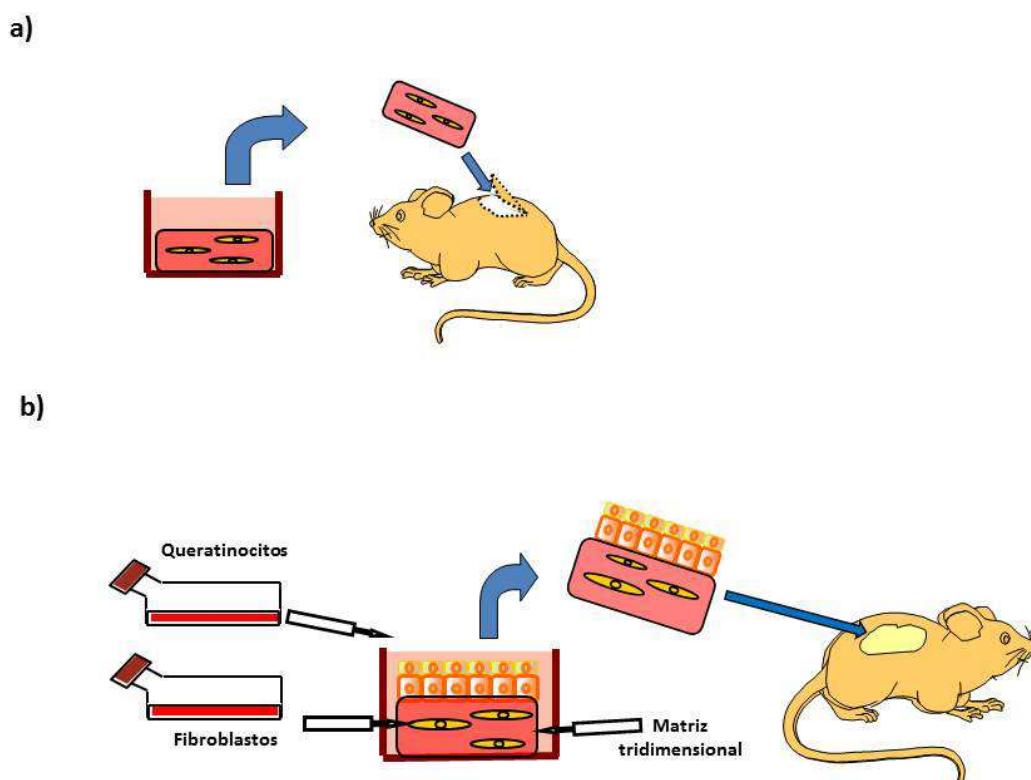


Figura 29: Esquema ilustrativo de la preparación de los equivalentes dérmicos (a) y dermo-epidérmicos (b) bioingenierizados.

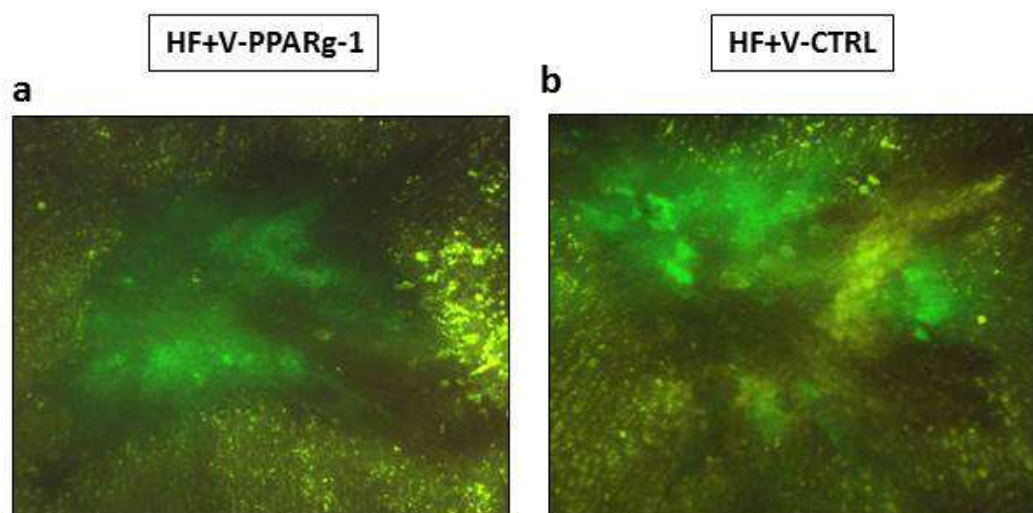


Figura 30: Detección de fluorescencia de GFP transcutánea por iluminación con luz azul sobre la piel del ratón 4 semanas después del trasplante subcutáneo. **a):** HF+V-PPARg-1+GFP. **b):** HF+V-CTRL+GFP. Aumento 6.3X

4.2. Trasplante de equivalentes dermo-epidérmicos

Considerando que los adipocitos son una parte esencial del tejido subcutáneo, constituyentes del panículo adiposo en la hipodermis, decidimos trasplantar fibroblastos control HF y lipodistróficos LD reprogramados formando parte de una matriz que constituye el componente dérmico de unos equivalentes cutáneos, sobre la que se cultivan queratinocitos humanos que forman una epidermis. Para ello, como se hizo previamente para los trasplantes subcutáneos, se coinfectaron los fibroblastos (HF y LD), por una parte, con un vector lentiviral codificante para la GFP con la intención de permitir el seguimiento de las células una vez trasplantadas al ratón y, por otra, con los vectores V-CTRL o V-PPARg-1. Se generaron matrices de fibrina que contenían embebidos esos fibroblastos modificados. Tras 48 horas se sembraron queratinocitos humanos procedentes de donantes sanos (Figura 29b; Materiales y Métodos apartado 18). Los equivalentes cutáneos se trasplantaron de manera ortotópica (2 geles de cada tipo) a un total de 8 ratones inmunodeficientes de la cepa nu/nu. Al cabo de 8 semanas, los animales fueron sacrificados y se analizaron los trasplantes de piel bajo una lupa con luz blanca y azul. Se pudo distinguir sobre el lomo de los animales el injerto de piel humana regenerada, que presentaba una morfología, textura y color diferentes a la piel murina (Figura 31a-d). Al observar las pieles bajo la luz azul, se confirmó en todas ellas la presencia de fluorescencia verde transepidérmica, que indicaba la persistencia de los fibroblastos humanos en la piel regenerada en el ratón (Figura 31e-h). La intensidad de la fluorescencia verde fue significativamente mayor en las pieles que contenían células lipodistróficas LD con respecto a las que contenían controles HF. Gracias a estos experimentos realizados *in vivo*, se pudo demostrar la capacidad de los HF y LD de mantenerse establemente formando parte de la hipodermis en una piel regenerada a partir de piel humana bioingenierizada, sin sufrir ningún proceso que condujera a su eliminación, como apoptosis, reabsorción por el tejido animal, senescencia, etc. Adicionalmente, tal como con los trasplantes subcutáneos, las células reprogramadas no provocaron en el ratón efecto tóxico o tumorigénico alguno ni afectaron la estructura de la piel, por lo que no parece haber indicios que desaconsejen su empleo en una posible aproximación terapéutica para la corrección de la LCG mediante su trasplante.

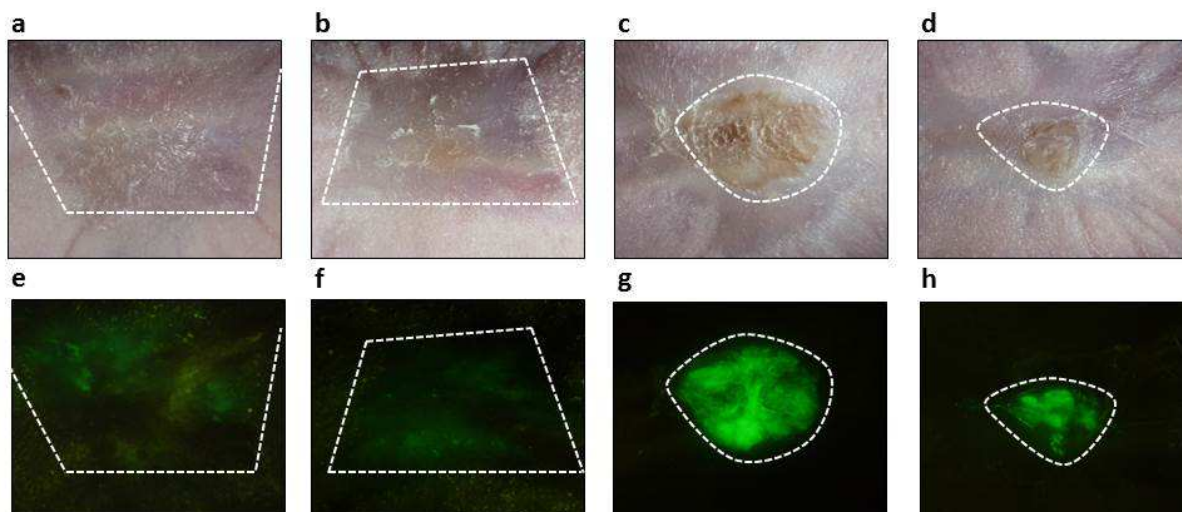


Figura 31: Aspecto de los trasplantes de equivalentes cutáneos bioingenierizados a ratones inmunodeficientes después de 8 semanas de la intervención. Se observa regeneración de piel humana de tonalidad más oscura que la de ratón. Iluminación con luz blanca (a-d) y luz azul (e-h) que permite ver la fluorescencia de GFP transepidérmica. **a), e):** HF+V-CTRL+GFP. **b), f):** HF+V-PPARg-1+GFP. **c), g):** LD-V-CTRL-GFP. **d), h):** LD-V-PPARg-1+GFP. Aumento 6.3X.

4.3. Inducción de la diferenciación adipogénica de fibroblastos HF y LD aislados de los equivalentes dermo-epidérmicos trasplantados a ratón

Con el objeto de determinar si los fibroblastos transducidos con PPARg-1, que habían permanecido establemente en los equivalentes dermo-epidérmicos durante 2 meses, conservaban su capacidad de experimentar diferenciación adipogénica, la piel humana regenerada en los ratones tras el trasplante fue procesada para recuperar dichas células. Una vez aisladas, se cultivaron hasta que alcanzaron la confluencia, momento en el que fueron expuestas al medio de cultivo DIR. Solo 3 días después de la adición del medio aparecieron células que contenían vesículas lipídicas en su citoplasma. Al cabo de 10 días un alto porcentaje (60%) de las mismas habían diferenciado y poseían un gran número de gotas de grasa en su interior (Figura 32a). Como muestra la figura 32b, mediante microscopía de fluorescencia pudimos observar cómo las células que contenían vesículas emitían fluorescencia verde, lo que indicaba que eran las mismas células humanas que anteriormente habían sido trasplantadas al ratón. Por último, se realizó la tinción del cultivo con *Oil Red O*, que confirmó la naturaleza lipídica de las vesículas citoplasmáticas (Figura 32c). Por consiguiente, las células controles HF y lipodistróficas LD transducidas con V-PPARg-1 no solo eran capaces de mantenerse establemente en los equivalentes cutáneos, sino que además conservaban su potencial adipogénico al ser expuestos a los estímulos del medio DIR.

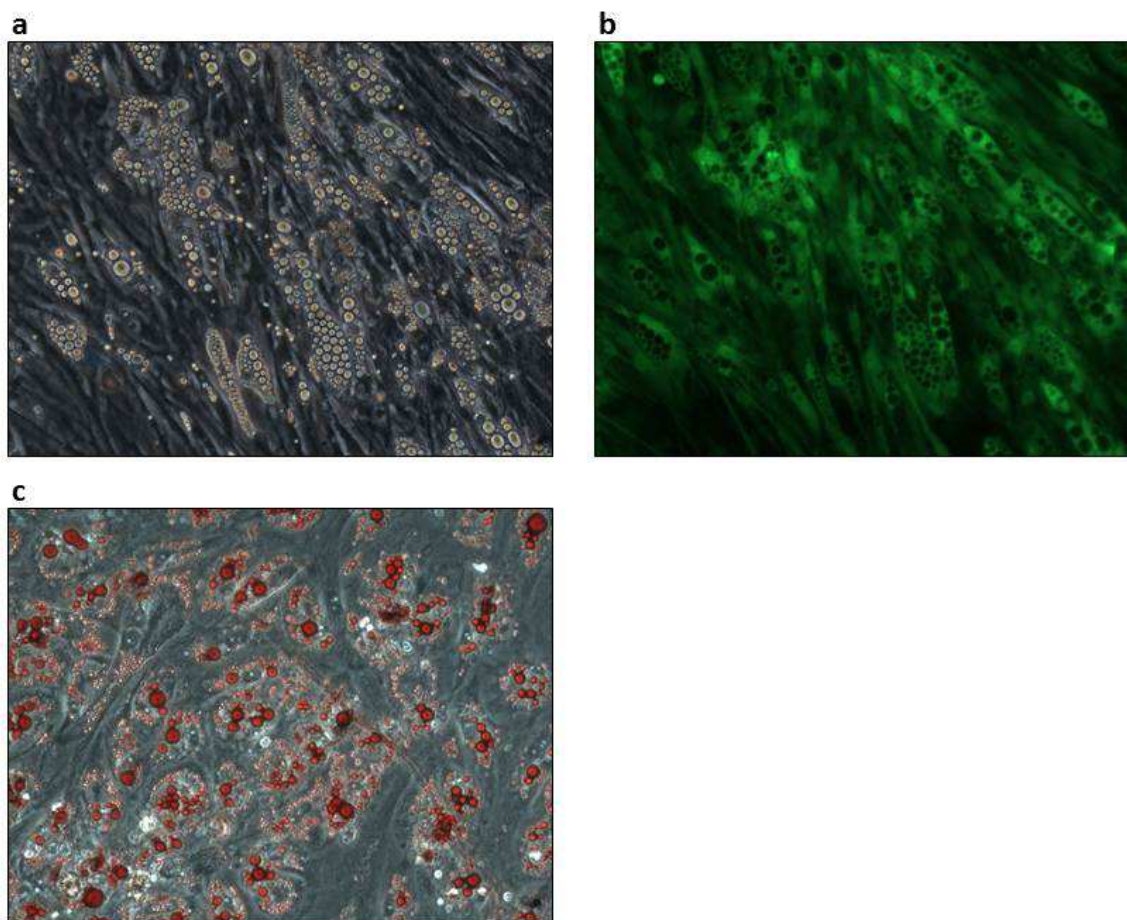


Figura 32: Microscopía de contraste de fases (a, c) y de fluorescencia (b) de las células LD (AGPAT2 $-/-$) transducidas con VGIP-PPAR γ -1+GFP, integradas en un equivalente cutáneo trasplantado a ratón, extraídas del trasplante de 8 semanas y sembradas en presencia del medio de diferenciación DIR durante 10 días. Imágenes antes (a, b) y después (c) de realizar la tinción con el colorante *Oil Red O*. Aumento 200X.

4.4. Adipogénesis *in vivo*: Administración oral de rosiglitazona a ratones trasplantados con equivalentes dermo-epidérmicos formados por HF y LD reprogramados

La persistencia de las células reprogramadas en los tejidos bioingenierizados nos indujo a llevar a cabo un experimento de diferenciación adipocítica *in vivo* mediante administración de rosiglitazona a 3 de los 6 animales trasplantados de forma subcutánea. Los otros 2 animales control recibieron solución fisiológica. Tras 12 días de administración oral (mediante sonda gástrica) diaria de una dosis de 200 mg de rosiglitazona, los animales fueron sacrificados y se llevó a cabo un estudio histopatológico de las zonas trasplantadas que macroscópicamente presentaban fluorescencia verde (Figura 33 b, d). A nivel macroscópico, los trasplantes de los animales tratados con rosiglitazona mostraron una apariencia más globulosa y brillante consistente con la presencia de tejido adiposo (Figura 33a) en comparación con los trasplantes control (Figura 33c) que mostraban un aspecto más

fibroso. A nivel microscópico, se pudo demostrar que los fibroblastos trasplantados no presentaban ninguna característica patológica y que parecían existir indicios de diferenciación adiposa aunque no de manera concluyente fundamentalmente por motivos técnicos. Nuevos experimentos *in vivo* están en curso, pero lamentablemente no se han podido incluir en este trabajo.

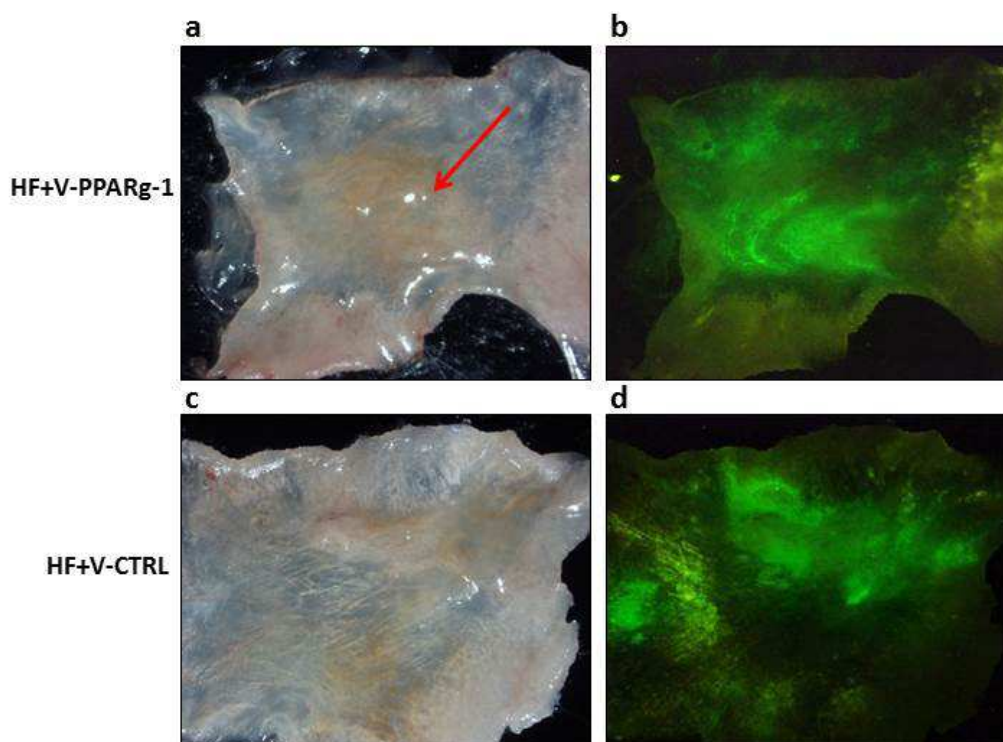


Figura 33: Aspecto del tejido subcutáneo injertado en ratón 6 semanas después de su trasplante y tras 12 días de administración oral de rosiglitazona. Iluminación con luz blanca (a, c) y luz azul (b, d). **a) - b):** HF+V-PPARg-1+GFP. **c-d):** HF+V-CTRL+GFP. Aumento 6.3X. La flecha roja indica la localización del tejido injertado (GFP+) donde se observó el posible tejido adiposo.

5. ANEXO

Tras la realización de los experimentos descritos en este apartado, tuvimos acceso a fibroblastos dérmicos de otro paciente de LCG de tipo 1 portador de mutaciones en AGPAT2 distintas de las del paciente con el que se llevaron a cabo todos los estudios anteriores. Como experimento complementario a nuestro estudio, se decidió transducir esos fibroblastos con PPARg-1 para determinar su capacidad de experimentar diferenciación adipogénica en presencia del medio DIR. Una vez reprogramadas y tras 10 días en presencia de los estímulos pro-adipogénicos, las células derivadas de este paciente mostraban síntesis de vesículas lipídicas en su citoplasma (Figura 34a). La tinción con *Oil Red O* fue positiva en estos cultivos diferenciados (Figura 34b). Estos resultados indicaban que la reprogramación mediante la sobreexpresión de PPARg-1 de los fibroblastos

dérmicos lipodistróficos era reproducible en células de otro paciente y podía llevarse a cabo independientemente del tipo de mutación causal.

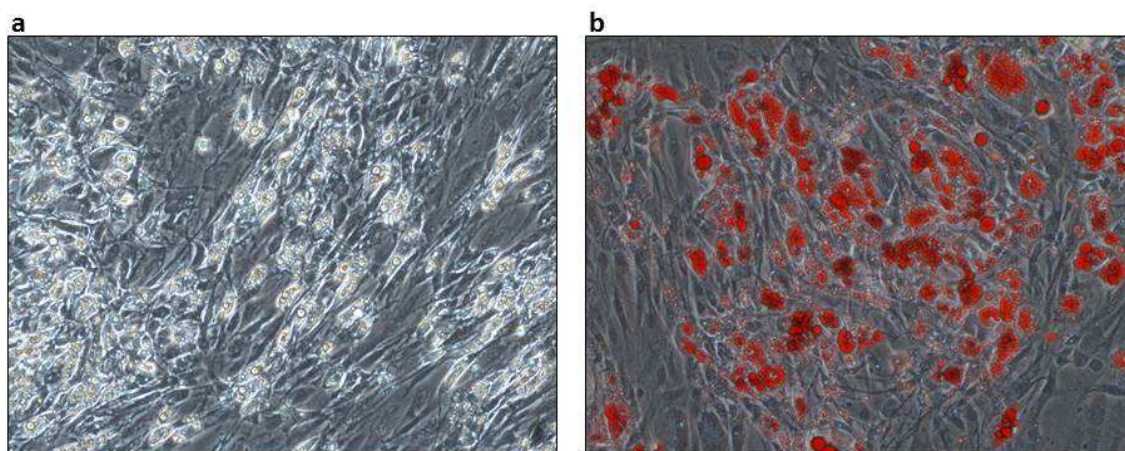


Figura 34: Microscopía de contraste de fases de LD (paciente 2) transducidos con VGIP-PPAR γ - 1 tras 10 días en presencia del medio de diferenciación DIR, antes (a) y después (b) de la tinción con el colorante *Oil Red O*. Aumento 100X.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Avances terapéuticos en el tratamiento de la Lipodistrofia Congénita Generalizada

Las aproximaciones combinadas de terapia génica y celular se contemplan en la actualidad para la corrección *ex vivo* de células mediante la transferencia de material genético y su posterior implante a tejidos de pacientes con deficiencias funcionales que provocan patologías concretas. Algunos procedimientos de terapia celular somática se aplican ya en la clínica, como es el caso de los injertos de pieles bioingenierizadas para el tratamiento de quemados, el auto-implante de condrocitos en lesiones de rodilla o la introducción de células beta pancreáticas en pacientes con diabetes de tipo 1 (Benneker et al., 2014; Ronfard et al., 2000; Ryan et al., 2001). La combinación génica y celular se ha llevado a cabo, a nivel clínico, en pacientes con inmunodeficiencias genéticas y otras patologías hematopoyéticas (Egawa and Inoue, 2013; Raya et al., 2009) así como en un caso de enfermedad cutánea, la epidermólisis bullosa juntural (Mavilio et al., 2006). En este trabajo de tesis doctoral, nosotros proponemos una aproximación de terapia génica/celular alternativa para la LCG. Ésta es una enfermedad cuya principal característica es la ausencia de tejido adiposo, la cual conlleva a niveles circulantes de adipoquinas muy disminuidos. Esto provoca en los pacientes diabetes severa y una acusada hipertrigliceridemia que en muchos casos son difíciles de controlar. Para su tratamiento se han desarrollado, hasta ahora, diferentes fármacos y protocolos de acción, que siempre incluyen el control de la dieta de manera que contenga un porcentaje muy bajo de grasas y la realización de ejercicio físico (Jones et al., 2001; Krauss et al., 2000). En cuanto a los fármacos empleados, entre los más importantes cabe resaltar la Metformina, un eficaz sensibilizador a la insulina y las TZDs, que al ser agonistas de PPAR γ , también ayudan a controlar la diabetes de estos pacientes disminuyendo las concentraciones plasmáticas de glucosa (Ludtke et al., 2005; Schindler et al., 2009). Sin embargo, estos tratamientos farmacológicos presentan algunos problemas que incluyen toxicidad hepática, pérdida de tejido óseo, problemas cardiovasculares o edema (Lago et al., 2007; Nissen and Wolski, 2007; Yaturu et al., 2007), y además no consiguen resolver por completo los trastornos metabólicos que sufren los pacientes. Actualmente existe un tratamiento que se encuentra en fase de ensayo clínico (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00025883), consistente en el uso de leptina recombinante humana (metreleptina) administrada a diario mediante inyección subcutánea. Esta terapia consigue normalizar la trigliceridemia y los niveles de insulina en sangre, además de disminuir considerablemente el volumen hepático y solucionar las anomalías menstruales de las mujeres que padecen esta enfermedad, entre otros beneficios metabólicos (Beltrand et al., 2007; Oral et al., 2002). Dicho ensayo constituye, además, la primera evidencia de que la leptina funciona como un

agente sensibilizador a la insulina *in vivo* en humanos y es, a día de hoy, la más eficaz y prometedora terapia para la LCG. Las estrategias terapéuticas dirigidas a la reposición de leptina y otras adipoquinas deben, por tanto, contemplarse como opciones válidas y de alto potencial para el desarrollo de nuevos protocolos clínicos para la LCG. Por otra parte, tratamientos basados en injertos de tejidos capaces de secretar esas moléculas podrían constituir terapias a más largo plazo que harían innecesaria la continua administración de fármacos a los pacientes.

En nuestro laboratorio se ha abordado la corrección de la LCG atendiendo al defecto celular primario, que ocasiona una ausencia total de tejido adiposo. Nuestro principal objetivo ha sido la búsqueda de una estrategia para la generación e injerto de células adiposas autólogas de paciente con funcionalidad para la secreción de adipoquinas, especialmente de leptina, la principal adipoquina de la que carecen los pacientes lipodistróficos.

2. Diferenciación adipogénica *in vitro*

2.1. Adipogénesis inducida por el medio de cultivo

El tipo celular de elección para estos experimentos fue el fibroblasto dérmico humano, que se puede obtener de manera sencilla y no agresiva mediante una pequeña biopsia de piel del paciente. Como ya se ha mencionado anteriormente, la heterogeneidad morfológica y funcional que caracteriza a los fibroblastos (Goldring et al., 1990; Sorrell et al., 2007, 2008) permite encontrar entre estas células algunas con la capacidad de experimentar diferenciación adipogénica. Si bien la célula madre mesenquimal podría reunir las características idóneas para nuestro propósito por su capacidad bien establecida de diferenciar a adipocitos, la imposibilidad de obtener estas células del tejido adiposo, inexistente en los pacientes de lipodistrofia, o de médula ósea, cuya extracción implica un procedimiento considerablemente invasivo, nos llevó a plantear el uso de fibroblastos dérmicos, células fácilmente accesibles. Por otra parte, puesto que las células MSC de paciente de LCG carecen del gen AGPAT2, se podría prever que su diferenciación adipogénica *in vitro* estaría impedida. De hecho, nuestros datos demostraron que el silenciamiento mediante shRNA de AGPAT2 en células MSC ocasionaba la pérdida de su capacidad de diferenciación adipogénica, por lo que la obtención de adipocitos autólogos de paciente a partir de ellas necesitaría de cualquier modo de una manipulación genética para reponer la función de AGPAT2. El uso de MSC no constituiría, por tanto, una ventaja sustancial respecto a los fibroblastos dérmicos, a partir de los cuales podemos conseguir diferenciación adipogénica por expresión forzada de PPAR γ -1.

Existen numerosos estudios en la literatura en los que se exploran diferentes vías para lograr la diferenciación a adipocitos de fibroblastos murinos (Braga et al., 2014; Hauner and Loffler, 1986;

Mackall et al., 1976; Peng et al., 2014). Sin embargo, las evidencias experimentales descritas en fibroblastos dérmicos humanos sobre diferenciación adipogénica son muy limitadas (Fischer et al., 2002; Jaager and Neuman, 2011), por lo que nuestro trabajo se centró inicialmente en la puesta a punto de protocolos de cultivo encaminados a lograr ese objetivo. Para el desarrollo de la metodología de diferenciación adipogénica de fibroblastos dérmicos humanos establecimos una colaboración con el laboratorio del Dr. Enrique Sáez en “*The Scripps Research Institute*”, California. En dicho laboratorio se trabaja en la búsqueda de nuevas dianas antidiabéticas mediante el estudio de la capacidad de una gran variedad de compuestos y genes para incrementar la adipogénesis celular. Ensayando distintas concentraciones de factores, encontramos que la diferenciación de los fibroblastos dérmicos requería la utilización de una concentración de insulina que duplica la usada habitualmente para la diferenciación de MSC. También determinamos que el empleo de rosiglitazona en el medio de cultivo, pero no de indometacina ni pioglitazona, era fundamental para la consecución de adipogénesis. La rosiglitazona es el ligando exógeno conocido que activa con más potencia a PPAR γ . Otros compuestos contenidos en el medio pro-adipogénico de elección fueron la IBMX (Isobutil-metil-xantina), un inhibidor de las fosfodiesterasas del AMP cíclico, y la dexametasona, un glucocorticoide capaz de incrementar la expresión y actividad de C/EBP β y δ . Por otra parte, se puso de manifiesto la importancia de que el cultivo celular hubiese alcanzado la confluencia antes de la adición del medio pro-adipogénico, ya que sin ese requisito no se producía diferenciación. Esto era esperable ya que proliferación y diferenciación son dos procesos incompatibles.

Por tanto, si bien previamente se conocían diversos medios de cultivo capaces de favorecer la adipogénesis de los fibroblastos dérmicos humanos (Blasi et al., 2011; Jaager and Neuman, 2011; Victoria et al., 2010), mi trabajo en este laboratorio permitió establecer las condiciones óptimas para conseguir la diferenciación de dichas células. Sin embargo, el porcentaje de fibroblastos dérmicos diferenciados empleando únicamente el medio de cultivo era muy bajo, al contrario de lo que ocurría con las MSC, que en condiciones similares de cultivo eran capaces de diferenciar eficazmente a adipocitos. Esto podría explicarse por el diferente control epigenético al que esté siendo sometido PPAR γ en cada tipo celular. Se ha especulado previamente sobre la posibilidad de que este factor se encuentre silenciado en tipos celulares diferentes de los adipocitos y sus precursores, mediante la metilación de histonas o de la propia secuencia del ADN (Sugii and Evans, 2011). La aparición de estímulos adipogénicos favorece la desmetilación de PPAR γ en células adiposas, pero esto probablemente no ocurra en tipos celulares como los fibroblastos dérmicos, lo que impediría su diferenciación. En base a esto, se planteó una segunda estrategia de diferenciación basada en la sobreexpresión de PPAR γ -1 en células dérmicas.

2.2 Adipogénesis promovida por sobreexpresión de PPARg

La correlación entre la sobreexpresión de PPARg y la formación de vesículas lipídicas confirmada mediante inmunofluorescencia (Figura 14) corroboró la necesidad de la expresión de este factor para que se produjera la diferenciación adipogénica de los fibroblastos dérmicos. La expresión forzada de PPARg-1 en esas células nos permitió conseguir elevados porcentajes de diferenciación en tiempos cortos (10 días). Se conseguía de esta forma “reprogramar” las células hacia un linaje responsivo a estímulos adipogénicos poniéndose de manifiesto el papel fundamental que juega el factor PPARg en el desarrollo de la adipogénesis celular. Estos resultados son coherentes con los trabajos realizados por Tontonoz y cols. (Tontonoz et al., 1994b) en los que se demuestra la capacidad de PPARg para estimular la diferenciación adipogénica de varias líneas celulares de fibroblastos murinos.

El gen PPARg da lugar a dos transcritos distintos, PPARg-1 y 2, que se encuentran bajo el control transcripcional de distintas regiones promotoras y codifican dos proteínas similares que difieren en su región amino terminal. Ambas isoformas se expresan en tejido adiposo, siendo la expresión de la isoforma PPARg-1 más ubicua y constitutiva, y la de la isoforma PPARg-2 específica de dicho tejido e inducible durante la diferenciación adipogénica, aunque la expresión de PPARg-1 también se incrementa en este proceso. En nuestros experimentos empleamos un vector retroviral codificante para PPARg-1, puesto que el incremento de actividad de esta isoforma en respuesta a los estímulos adipogénicos del medio de cultivo parece ser un mecanismo temprano de la adipogénesis en células competentes para esta diferenciación, como las MSC (Wang et al., 2013). El potencial de ambas isoformas de PPARg para inducir la adipogénesis en la línea celular de fibroblastos murinos 3T3 fue establecido por el laboratorio de Tontonoz (Mueller et al., 2002), en contraposición con otros autores, como Ren y cols. (Ren et al., 2002), que afirmaban la incapacidad de PPARg-1 para desencadenar este proceso.

Nuestros datos, obtenidos mediante RT-PCR con oligonucleótidos cebadores específicos en los primeros exones para diferenciar ambas isoformas, demuestran que una vez activado PPARg-1 en los fibroblastos dérmicos humanos se induce la expresión de PPARg-2, y esta expresión es mantenida durante todo el proceso de diferenciación. Ha sido previamente descrito como la expresión de ambas isoformas se incrementa significativamente durante la adipogénesis (Rosen and MacDougald, 2006; Wang et al., 2013). Kai Ge y cols. realizaron estudios de análisis de la regulación de la expresión de PPARg durante la adipogénesis. En ellos se puede apreciar cómo durante la diferenciación de los preadipocitos de ratón 3T3-L1, desde el primer día en que se añade el medio de diferenciación se induce la expresión de PPARg-1. Sin embargo, la expresión de PPARg-2 es

detectada posteriormente, a día 4 del proceso adipogénico, y ambos siguen aumentando sus niveles hasta alcanzar el máximo a día 8, cuando los adipocitos están completamente diferenciados (Wang et al., 2013). A pesar de que PPARg-2 se induce en segundo lugar, los niveles máximos de proteína alcanzados por esa isoforma son significativamente superiores a los de PPARg-1. Coherentemente con esto, en los experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio, no observamos expresión de PPARg-2 en HF ni LD previa a la sobreexpresión de PPARg-1, aunque se añadiese el medio DIR (Figura 18c y 27c). Una vez que se sobreexpresaba PPARg-1 mediante infección retroviral, a día 3 desde la adición del medio se detectó la expresión de la isoforma 2. Por otro lado, esto parecía indicar que en los fibroblastos dérmicos, a diferencia de los preadipocitos y de las MSC, la inducción de la isoforma 1 del gen PPARg por estímulos adipogénicos se encuentra bloqueada. Sin embargo, una vez que se fuerza su expresión, PPARg-1 es capaz de desencadenar el proceso de diferenciación en este tipo celular, como se demuestra por la activación de la expresión de PPARg-2 y de otros genes pro-adipogénicos, siguiendo la secuencia de expresión característica de la adipogénesis y resultando en la generación de adipocitos morfológicamente y funcionalmente maduros. Nuestro modelo de diferenciación muestra, por tanto, que la incapacidad del gen PPARg-1 de ser inducido por estímulos adipogénicos en fibroblastos dérmicos es el factor limitante del potencial adipogénico de este tipo celular y que, superada esta limitación, esas células son capaces de transdiferenciar a adipocitos. Como ya se mencionó en el apartado **2.1**, la falta de respuesta del gen PPARg a los estímulos adipogénicos podría ser debida a procesos epigenéticos, alguno de los cuales estarían mediados por HDAC3 (Histona Deacetilasa 3) (Sugii and Evans, 2011). Cabe especular también que la sobreexpresión de PPARg-1, además de conferir la susceptibilidad al estímulo adipogénico en los fibroblastos normales, podría actuar como capturador de algún ligando o molécula represora que mantuviese a PPARg (principalmente la isoforma 2) en un estado transcripcionalmente inactivo incapacitado de su autoinducción en las células carentes de AGPAT2.

3. Diferenciación adipogénica de células derivadas de paciente de LCG

La sobreexpresión de PPARg-1 en fibroblastos de paciente LD causó su diferenciación adipogénica con una alta eficiencia. La expresión de marcadores moleculares de adipogénesis, incluyendo la expresión de leptina, confirmó que la diferenciación a células grasas maduras era posible en ausencia de AGPAT2. Si bien en estos experimentos se apreciaron pequeñas variaciones en la eficiencia de diferenciación, que era ligeramente menor en fibroblastos LD con respecto a los HF transducidos con PPARg-1, esto se debía con toda probabilidad a la menor tasa de división celular que presentaban los LD, lo que provocaba que la infección con el vector retroviral V-PPARg-1 fuese menos efectiva.

Dado el papel central que se le atribuye a AGPAT2 en la biosíntesis del ácido fosfatídico, precursor de triglicéridos y fosfolípidos, la diferenciación adipogénica de fibroblastos dérmicos de paciente (LD) constituyó un hallazgo inesperado. El hecho de que la sobreexpresión de PPAR γ -1 permitiera superar el defecto en AGPAT2 demostró que, en esas condiciones de activación forzada de PPAR γ , AGPAT2 es prescindible para el desarrollo de la adipogénesis. Esta idea se confirmó en los experimentos de coinfección de los fibroblastos con los vectores PGK-AGPAT2 y V-PPAR γ -1 (Figura 16), en los que la sobreexpresión de AGPAT2 en células que ya sobreexpresaban PPAR γ -1 no condujo al aumento del porcentaje de células diferenciadas, mostrando que la carencia de AGPAT2 no era un factor limitante para la diferenciación en esas condiciones. La capacidad de esas células para diferenciar en ausencia de AGPAT2 nos hizo plantearnos si esto se podría extrapolar a otro tipo celular, lo que nos llevó a realizar ensayos de silenciamiento de AGPAT2 en MSC. Éstos mostraron como, aunque esa enzima era necesaria para la diferenciación de las MSC en medio adipogénico, al suplir su déficit con la sobreexpresión de PPAR γ -1 se conseguía rescatar a las células de la inhibición adipogénica, diferenciando del mismo modo que lo harían si AGPAT2 no estuviera silenciada (Figura 15).

La habilidad de las células LD para generar grasa en ausencia de la enzima AGPAT2, encargada de la biosíntesis del ácido fosfatídico, planteaba la incógnita del origen de dicho compuesto en estos fibroblastos. La posibilidad de que esa actividad enzimática estuviese siendo compensada por alguna de las isoformas de la familia de AGPAT quedó descartada al estudiarse la expresión de 2 de las isoformas que son capaces de expresarse en un mayor número de tejidos (AGPAT1 y AGPAT3) y de la isoforma específica de tejido adiposo marrón y de epitelio mamario, AGPAT6 (Figura 22). Ninguna de esas enzimas se detectó en células que habían diferenciado con éxito a adipocitos maduros.

Existe la posibilidad de que el ácido fosfatídico necesario para la síntesis de los triglicéridos y fosfolípidos provenga de otras actividades enzimáticas diferentes a la de AGPAT. Por ejemplo, la enzima fosfolipasa D cataliza la hidrólisis de la fosfatidilcolina generando ácido fosfatídico y colina. Muy recientemente, se ha descrito la presencia de niveles anormalmente elevados de dicha enzima en ratones AGPAT2 $^{-/-}$ (Sankella et al., 2014), la cual podría estar actuando como fuente alternativa de ácido fosfatídico. De hecho, en esos estudios, se observaron en los tejidos murinos altos niveles de ácido lisofosfatídico, el sustrato de la reacción, lo cual concuerda con la ausencia de actividad AGPAT2, que provoca la acumulación de ese compuesto. Por el contrario, el ácido fosfatídico no aparecía disminuido, sino que se encontraba incluso a niveles superiores a los fisiológicos, lo cual indicaba la existencia de una ruta alternativa de síntesis en ausencia de AGPAT2. La fosfolipasa D no es la única candidata a suplir la deficiencia de ácido fosfatídico derivada de la función anómala de

AGPAT2. La diacilglicerol quinasa es una enzima capaz de generar ácido fosfatídico a partir de 1,2-diacilglicerol utilizando ATP como fuente de fosfato, y su expresión se ha encontrado también elevada en ratones AGPAT2^{-/-} (Sankella et al., 2014). Estas dos enzimas podrían ser las responsables de la producción del ácido fosfatídico necesario para la síntesis de los triglicéridos y fosfolípidos que presentan los fibroblastos dérmicos de paciente una vez diferenciados a adipocitos.

Puesto que AGPAT2 parece no ser imprescindible para la síntesis de ácido fosfatídico pero su ausencia impide la diferenciación adipogénica *in vivo*, como queda de manifiesto por la ausencia de grasa en pacientes LD, esta enzima podría poseer una función adicional esencial en otro punto de este proceso biológico. Se podría deducir que AGPAT2 posee un papel regulador de la adipogénesis, siendo un activador fundamental de determinadas rutas de señalización que tienen la inducción de PPAR γ como punto final. Esta hipótesis es apoyada por las evidencias halladas por Burant y cols. (Subauste et al., 2012), quienes observaron cómo en células 3T3-L1 en las que se silenció AGPAT2 se producía un incremento del ácido fosfatídico cíclico, un conocido inhibidor de PPAR γ . Este compuesto es un análogo natural ciclado del ácido lisofosfatídico y se genera a partir de la transfosfatidilación de la lisofosfatidilcolina, mientras que el ácido lisofosfatídico se forma mediante la hidrólisis del mismo precursor. Curiosamente, ambos análogos tienen acciones biológicas opuestas (Fujiwara, 2008). Este mismo grupo describió cómo la sobreexpresión de AGPAT2, sin embargo, reducía significativamente los niveles del ácido fosfatídico cíclico, lo cual permitiría la activación de PPAR γ y, por tanto, de la adipogénesis. Este mecanismo podría explicar la diferenciación adipogénica en ausencia de AGPAT2 mediada por sobreexpresión de PPAR γ -1 que hemos encontrado, ya que los niveles elevados de PPAR γ podrían compensar el incremento de la posible acción inhibidora del ácido fosfatídico cíclico. La posibilidad de conseguir la reprogramación adipogénica mediante sobreexpresión de PPAR γ -1 de células de paciente de LCG de tipo 2 al igual que las de tipo 1, demostrada a lo largo de nuestros experimentos, amplía el posible espectro de acción de esta estrategia terapéutica. Este subtipo de LCG se caracteriza por mutaciones en el gen BSCL2, que codifica la seipina, una proteína cuya función no está completamente definida, aunque se ha planteado como responsable de la fusión de las vesículas lipídicas citoplasmáticas de los adipocitos (Garg and Agarwal, 2009). Quizá la expresión forzada de PPAR γ consigue activar la adipogénesis a un nivel global, superándose de esa forma algunos defectos genéticos relacionados funcionalmente. Esto supondría una ventaja desde el punto de vista terapéutico, ya que con una misma aproximación se podrían corregir distintos subtipos de LCG. Sin embargo, esta hipótesis debe ser aun probada en casos de LCG causados por mutaciones en caveolina y cavina. Recientemente, Magre y cols (Priour et al., 2013) observaron una mejoría del fenotipo de ratones con mutaciones en el gen de la seipina al ser tratados con pioglitazona, lo cual podría indicar que en ese subtipo de LCG

el bloqueo funcional de PPAR γ no es tan crítico como en la LCG de tipo 1. Sería muy interesante disponer de MSC provenientes de pacientes de ambos tipos de lipodistrofias para determinar la respuesta a las TZD, lo cual aportaría información sobre el grado de bloqueo de la función de PPAR γ .

4. Caracterización funcional de los adipocitos derivados de fibroblastos dérmicos HF y LD

Una vez superado el defecto en el gen AGPAT2, la caracterización de las células diferenciadas obtenidas a partir de los fibroblastos HF y LD mostró que tanto las células control como lipodistróficas eran capaces de llevar a cabo toda la secuencia adipogénica hasta adipocitos maduros. El análisis de su perfil adipogénico reveló la expresión de los factores de transcripción pro-adipogénicos aP2, C/EBP α y PPAR γ -2. Además, se detectó la expresión de las adipoquinas adiponectina y leptina en las células diferenciadas, lo cual constituye un punto muy importante, ya que dichas moléculas son las que dotan de funcionalidad metabólica al tejido adiposo blanco.

En nuestros experimentos se observaba una expresión de los factores de transcripción C/EBP α y aP2 a día 3 desde la adición del medio, que se mantenía hasta el final del proceso (Figura 18a ,b y 27a,b). Este patrón temporal es coherente con el observado en preadipocitos 3T3-L1 al diferenciar a adipocitos maduros (Victoria et al., 2010; Wu et al., 1998). Estos factores necesitan que pasen 72 horas para expresarse en cantidades elevadas, al contrario de lo que ocurre con C/EBP β y C/EBP δ , que se detectan inmediatamente tras la adición del medio de diferenciación (Wu et al., 1998). Respecto a PPAR γ -2, se detectó su expresión a días 3 y 12 pero no a día 0, ya que las células habían sido infectadas con la isoforma 1 y los oligonucleótidos usados en las RT-PCR detectaban específicamente PPAR γ -2 (Figura 18c y 27c). El punto fundamental fue que tanto las células HF como las LD provenientes de paciente con LCG de tipo 1 y 2 fueron capaces de expresar estos factores al estar transducidas con PPAR γ -1, indicando que se había conseguido superar la deficiencia adipogénica inicial de las mismas. Como se mencionó anteriormente, también se estudió la expresión de dos adipoquinas que son sintetizadas por el tejido adiposo y vertidas al torrente sanguíneo, y que ejercen importantes funciones a nivel metabólico. Mientras que la adiponectina presentaba niveles significativos de ARN a día 3, la leptina requería más tiempo de diferenciación para expresarse y no era detectada hasta día 12 (Figura 18d y 27d). Esta adipoquina es el marcador de adipocitos maduros por excelencia. Por esto, se estudió no solo la expresión de su ARN mensajero, sino la capacidad de las células HF y LD para sintetizar y liberar esta proteína al medio de cultivo (Figura 19). Una vez que las células estuvieron expuestas durante 30 días al medio DIR, se detectó la presencia de proteína leptina en el medio mediante un ensayo de ELISA. De nuevo, las células lipodistróficas exhibían su potencial adipogénico al sintetizar esta adipoquina.

La formación de vesículas lipídicas uniloculares es un rasgo característico de los adipocitos maduros *in vivo*. En todos los trabajos descritos en la literatura sobre diferenciación adipogénica de fibroblastos dérmicos humanos (Blasi et al., 2011; Jaager and Neuman, 2011; Victoria et al., 2010), las células resultantes exhiben en su citoplasma vesículas multiloculares, que es el tipo de diferenciación que se obtiene *in vitro* empleando medios de cultivo específicos. Sin embargo, en nuestros experimentos se conseguía una diferenciación terminal que permitió la formación de vesículas uniloculares en las células expuestas durante 1 mes al medio DIR (Figura 20), lo que indicaba que habíamos conseguido generar adipocitos maduros.

4.1 Señalización mediada por Akt en células LD

Numerosos estudios demuestran la implicación de Akt en la regulación de la adipogénesis mediante su participación en la vía de señalización de la insulina (Li et al., 2013; Liang et al., 2013; Zhang et al., 2009). Una reducción de la activación de esta proteína en pacientes lipodistróficos ha sido descrita por algunos autores. En base a esto, se ha postulado que AGPAT2 podría ser importante para la regulación de la ruta PI3K/Akt, de manera que en los pacientes con LCG los bajos niveles de ácido fosfatídico condujeran a una escasez de PIP₃, producto que activa a Akt a través de su reclutamiento a la membrana. De esta forma, la señalización de Akt se vería afectada (Subauste et al., 2012).

Sin embargo, los experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio no mostraron disminución de la activación de Akt en los pacientes de LCG de tipo 1 y 2 analizados. Tampoco se observaron diferencias en la cantidad de proteína total entre pacientes y células control (Figura 23 y 28).

Nuestros resultados podrían sugerir la existencia de una variabilidad en la afectación de esa vía de señalización entre los pacientes con LCG o, alternativamente, que ésta no sea la ruta fundamental afectada en esta enfermedad.

5. Perfil lipidómico de los adipocitos derivados de fibroblastos dérmicos HF y LD

Los estudios de lipidómica de este trabajo de tesis se realizaron en un contexto de colaboración con el grupo de Rosario Domingues de la Universidad de Aveiro, Portugal. Los datos obtenidos mostraron cantidades totales de fosfolípidos, triglicéridos y colesterol de los mismos órdenes de magnitud en los tres tipos celulares analizados (MSC, HF y LD). La separación de los distintos tipos de fosfolípidos mediante cromatografía de capa fina nos permitió analizar siete subtipos, presentes en MSC, HF y LD: lisofosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y cardiolipina (Figura 24). La cuantificación de esos compuestos no mostró diferencias importantes entre unas clases de células y otras. Respecto al análisis de los triglicéridos,

mediante espectrometría de masas se identificaron especies comunes a los tres tipos de células, pero en este caso sí se detectaron algunas diferencias entre MSC, HF y LD.

En conjunto, nuestro análisis de lípidos mostró que, si bien las tres clases de células (MSC, HF y LD) exhibían el mismo patrón de expresión de genes pro-adipogénicos y adipoquinas, el perfil lipídico variaba ligeramente entre ellas. El tipo celular del que provenía el adipocito parecía influir en las especies de triglicéridos que se generaban y, probablemente, la ausencia de AGPAT2 estuviera también implicada en esas diferencias. Las variaciones en la longitud y saturación de los ácidos grasos que forman los triglicéridos podrían reflejar la síntesis de ácido fosfatídico por distintos enzimas en el caso de las células LD, que carecen de AGPAT2, por lo que los sustratos y los productos podrían cambiar.

Los ácidos grasos están implicados en la regulación de algunos procesos metabólicos e inflamatorios del tejido adiposo, por lo que cabría pensar que estas diferencias de composición lipídica podrían generar alguna alteración a esos niveles. Futuros experimentos *in vivo* permitirán analizar el alcance e importancia de estas alteraciones. Por otra parte, el punto clave de estos experimentos, que era conseguir la formación de TG y la síntesis de adipoquinas por las células LD, se daba a pesar de esas ligeras diferencias en el perfil lipídico.

6. Potencial terapéutico de las células LD en la generación de sistemas cutáneos bioingenierizados para la terapia génica y celular

Nuestros experimentos *in vivo* mostraron que tanto los fibroblastos de donantes sanos como los de pacientes de LCG corregidos con PPAR γ -1, al ser trasplantados bien de manera subcutánea o como parte de pieles bioingenierizadas en ratones inmunodeficientes, se mantenían a largo plazo en el animal sin producir efectos tóxicos o tumorigénicos (Figuras 30 y 31). Además, al recuperarse esas células del tejido, conservaban la capacidad de diferenciarse a adipocitos al ser expuestos al medio DIR (Figura 32). Esto demostraba que nuestra aproximación de terapia celular era factible, ya que las células modificadas genéticamente en nuestros ensayos poseían la capacidad de persistir de manera estable conservando toda su funcionalidad.

En nuestro laboratorio, la metodología de generación de equivalentes dermo-epidérmicos había sido usada previamente para la obtención de modelos animales para el estudio de diferentes enfermedades cutáneas (Carretero et al., 2013; Gache et al., 2004) y, también, para forzar la expresión de leptina como herramienta terapéutica. Se consiguió, de esa forma, la generación de pieles bioingenierizadas constituidas por queratinocitos humanos que sobreexpresaban leptina, las cuales fueron trasplantadas a ratones ob/ob (deficientes en leptina) lográndose revertir su fenotipo

diabético y su exceso de peso (Larcher et al., 2001). Sin embargo, en esos ensayos la expresión de leptina se daba de forma constitutiva ya que era dirigida por un promotor inespecífico. En esta tesis quisimos aprovechar las ventajas que ofrecen los equivalentes dermo-epidérmicos para generar una piel humana con un componente dérmico con potencial adipogénico, compuesto por células capaces de sintetizar leptina de forma regulada y controlada, en respuesta a las necesidades metabólicas del organismo y no de forma continuada. El trasplante de estas células con propiedades adipogénicas y capacidad de regenerar grasa funcional podría plantearse como una aproximación terapéutica para corregir, a nivel sistémico, los defectos metabólicos que cursan con la LCG.

En resumen, en este trabajo de tesis doctoral hemos conseguido establecer las condiciones necesarias para diferenciar eficientemente fibroblastos dérmicos a adipocitos mediante una metodología que es válida, incluso, para la diferenciación adipogénica de células provenientes de pacientes lipodistróficos. Además, se ha puesto de manifiesto la necesidad de la actividad PPAR γ para el correcto desarrollo de la adipogénesis humana, así como el papel crucial que juega como principal conductor y regulador de este proceso. Por su perfil de expresión de genes pro-adipogénicos, su capacidad de secreción de leptina, su perfil lipídico y su estabilidad en los equivalentes dermo-epidérmicos, estas células son buenas candidatas para ser usadas en la generación de sistemas bioingenierizados que podrían constituir un procedimiento de terapia génica y celular para el tratamiento de la LCG.

Como experimentos futuros, sería adecuado seguir profundizando en el desarrollo de protocolos de trasplante de adipocitos para avanzar en la consecución de un tejido adiposo *in vivo*. La realización de estos procedimientos en un modelo animal de lipodistrofia y el posterior análisis de su capacidad para revertir el fenotipo de la enfermedad, podría aportar información de gran relevancia para mejorar nuestro conocimiento sobre la LCG y buscar nuevas estrategias encaminadas a su corrección.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se han caracterizado las condiciones necesarias para el establecimiento de un sistema eficiente de reprogramación y diferenciación adipogénica de fibroblastos dérmicos humanos en base a la sobreexpresión del factor de transcripción PPARg-1.
2. Las condiciones establecidas son necesarias y suficientes para que se produzca la diferenciación adipogénica de células dérmicas de pacientes con lipodistrofia congénita generalizada de tipo 1 y 2 sin necesidad de la restauración de las actividades enzimáticas de los genes AGPAT2 o BSCL2.
3. La adipogénesis inducida por la sobreexpresión de PPARg-1 en fibroblastos dérmicos humanos control y de paciente de lipodistrofia congénita generalizada tipo 1 y 2 es indistinguible de la que experimentan los preadipocitos humanos en lo que se refiere al patrón de expresión de factores de transcripción y adipoquinas.
4. La diferenciación adiposa, por sobreexpresión de PPARg-1, en ausencia de AGPAT2 indica que esta enzima posee, en condiciones normales, una función fundamental adicional sobre la activación de vías de señalización que conducen a la inducción de PPARg y que su papel en la síntesis de triglicéridos puede ser sustituido por otras actividades enzimáticas alternativas.
5. Los cambios observados en el perfil lipídómico en cuanto a la longitud y saturación de ácidos grasos laterales de los triglicéridos en las células que sobreexpresan PPARg-1 parecen ser las únicas alteraciones derivadas de la ausencia de AGPAT2.
6. Los fibroblastos dérmicos de donantes sanos y de pacientes de lipodistrofia congénita generalizada sobreexpresando PPARg-1, trasplantados de forma subcutánea o como parte de pieles bioingenierizadas en ratones inmunodeficientes, se mantienen a largo plazo en el receptor sin producir efectos tóxicos o tumorigénicos.
7. Puesto que los fibroblastos modificados genéticamente para sobreexpresar PPARg-1 poseen un potencial adipogénico que incluye la secreción de adipoquinas, el trasplante de estas células diferenciadas *in vitro* o *in vivo* se plantea como un abordaje de terapia génica y celular válido para el tratamiento de la lipodistrofia congénita generalizada.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Agarwal, A. K., Arioglu, E., De Almeida, S., Akkoc, N., Taylor, S. I., Bowcock, A. M., Barnes, R. I. and Garg, A. (2002). "AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34." *Nat Genet* 31(1): 21-23.

Agarwal, A. K., Barnes, R. I. and Garg, A. (2004). "Genetic basis of congenital generalized lipodystrophy." *Int J Obes Relat Metab Disord* 28(2): 336-339.

Agarwal, A. K. and Garg, A. (2004). "Seipin: a mysterious protein." *Trends Mol Med* 10(9): 440-444.
 Agarwal, A. K., Simha, V., Oral, E. A., Moran, S. A., Gorden, P., O'Rahilly, S., Zaidi, Z., Gurakan, F., Arslanian, S. A., Klar, A., Ricker, A., White, N. H., Bindl, L., Herbst, K., Kennel, K., Patel, S. B., Al-Gazali, L. and Garg, A. (2003). "Phenotypic and genetic heterogeneity in congenital generalized lipodystrophy." *J Clin Endocrinol Metab* 88(10): 4840-4847.

Agarwal, A. K., Sukumaran, S., Cortes, V. A., Tunison, K., Mizrachi, D., Sankella, S., Gerard, R. D., Horton, J. D. and Garg, A. (2011). "Human 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase isoforms 1 and 2: biochemical characterization and inability to rescue hepatic steatosis in *Agpat2*(-/-) gene lipodystrophic mice." *J Biol Chem* 286(43): 37676-37691.

Akerman, F., Lei, Z. M. and Rao, C. V. (2002). "Human umbilical cord and fetal membranes co-express leptin and its receptor genes." *Gynecol Endocrinol* 16(4): 299-306.

Amitani, M., Asakawa, A., Amitani, H. and Inui, A. (2013). "The role of leptin in the control of insulin-glucose axis." *Front Neurosci* 7: 51.

Anghel, S. I., Bedu, E., Vivier, C. D., Descombes, P., Desvergne, B. and Wahli, W. (2007). "Adipose tissue integrity as a prerequisite for systemic energy balance: a critical role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma." *J Biol Chem* 282(41): 29946-29957.

Archer, A., Stolarczyk, E., Doria, M. L., Helguero, L., Domingues, R., Howard, J. K., Mode, A., Korach-Andre, M. and Gustafsson, J. A. (2013). "LXR activation by GW3965 alters fat tissue distribution and adipose tissue inflammation in ob/ob female mice." *J Lipid Res* 54(5): 1300-1311.

Baar, R. A., Dingfelder, C. S., Smith, L. A., Bernlohr, D. A., Wu, C., Lange, A. J. and Parks, E. J. (2005). "Investigation of in vivo fatty acid metabolism in *AFABP/aP2*(-/-) mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(1): E187-193.

Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J. P., Bortoluzzi, M. N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y. and Lewin, M. J. (1998). "The stomach is a source of leptin." *Nature* 394(6695): 790-793.

Barak, Y., Nelson, M. C., Ong, E. S., Jones, Y. Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K. R., Koder, A. and Evans, R. M. (1999). "PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development." *Mol Cell* 4(4): 585-595.

Barrandon, Y., Li, V. and Green, H. (1988). "New techniques for the grafting of cultured human epidermal cells onto athymic animals." *J Invest Dermatol* 91(4): 315-318.

Baxa, C. A., Sha, R. S., Buelt, M. K., Smith, A. J., Matarese, V., Chinander, L. L., Boundy, K. L. and Bernlohr, D. A. (1989). "Human adipocyte lipid-binding protein: purification of the protein and cloning of its complementary DNA." *Biochemistry* 28(22): 8683-8690.

Beltrand, J., Beregszaszi, M., Chevenne, D., Sebag, G., De Kerdanet, M., Huet, F., Polak, M., Tubiana-Rufi, N., Lacombe, D., De Paoli, A. M. and Levy-Marchal, C. (2007). "Metabolic correction induced by leptin replacement treatment in young children with Berardinelli-Seip congenital lipoatrophy." *Pediatrics* 120(2): e291-296.

Benneker, L. M., Cucchiari, M., Madry, H., Guilak, F., Saris, D. B., Stoddart, M. J., Koon Wong, M. and Roughley, P. (2014). "A vision on the future of articular cartilage repair." *Eur Cell Mater* 27: 12-16.

Bernlohr, D. A., Doering, T. L., Kelly, T. J., Jr. and Lane, M. D. (1985). "Tissue specific expression of p422 protein, a putative lipid carrier, in mouse adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 132(2): 850-855.

Binns, D., Lee, S., Hilton, C. L., Jiang, Q. X. and Goodman, J. M. (2010). "Seipin is a discrete homooligomer." *Biochemistry* 49(50): 10747-10755.

Birsoy, K., Chen, Z. and Friedman, J. (2008). "Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4." *Cell Metab* 7(4): 339-347.

Blasi, A., Martino, C., Balducci, L., Saldarelli, M., Soleti, A., Navone, S. E., Canzi, L., Cristini, S., Invernici, G., Parati, E. A. and Alessandri, G. (2011). "Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential." *Vasc Cell* 3(1): 5.

Braga, M., Reddy, S. T., Vergnes, L., Pervin, S., Grijalva, V., Stout, D., David, J., Li, X., Tomasian, V., Reid, C. B., Norris, K. C., Devaskar, S. U., Reue, K. and Singh, R. (2014). "Follistatin promotes adipocyte differentiation, browning, and energy metabolism." *J Lipid Res* 55(3): 375-384.

Cabre, A., Lazaro, I., Girona, J., Manzanares, J. M., Marimon, F., Plana, N., Heras, M. and Masana, L. (2007). "Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients." *Atherosclerosis* 195(1): e150-158.

Cao, H., Maeda, K., Gorgun, C. Z., Kim, H. J., Park, S. Y., Shulman, G. I., Kim, J. K. and Hotamisligil, G. S. (2006). "Regulation of metabolic responses by adipocyte/macrophage Fatty Acid-binding proteins in leptin-deficient mice." *Diabetes* 55(7): 1915-1922.

Cao, Z., Umek, R. M. and McKnight, S. L. (1991). "Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells." *Genes Dev* 5(9): 1538-1552.

Caron-Debarle, M., Lagathu, C., Boccarda, F., Vigouroux, C. and Capeau, J. (2010). "HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging." *Trends Mol Med* 16(5): 218-229.

Carretero, M., Guerrero-Aspizua, S. and Del Rio, M. (2013). "Bioengineered skin humanized model of psoriasis." *Methods Mol Biol* 961: 305-323.

Cortes-Canteli, M., Pignatelli, M., Santos, A. and Perez-Castillo, A. (2002). "CCAAT/enhancer-binding protein beta plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells." *J Biol Chem* 277(7): 5460-5467.

Cristancho, A. G. and Lazar, M. A. (2011). "Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation." *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(11): 722-734.

Cronin, P. A., Myers, E., Redmond, H. P., O'Reilly, S. and Kirwan, W. O. (2010). "Lipomatosis: an unusual side-effect of cytotoxic chemotherapy?" *Acta Derm Venereol* 90(3): 303-304.

Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y. H., Doria, A., Kolodny, G. M. and Kahn, C. R. (2009). "Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans." *N Engl J Med* 360(15): 1509-1517.

Chandrasekaran, C. and Gordon, J. I. (1993). "Cell lineage-specific and differentiation-dependent patterns of CCAAT/enhancer binding protein alpha expression in the gut epithelium of normal and transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(19): 8871-8875.

Chen, Y., Shao, J. Z., Xiang, L. X., Dong, X. J. and Zhang, G. R. (2008a). "Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine." *Int J Biochem Cell Biol* 40(5): 815-820.

Chen, Y. Q., Kuo, M. S., Li, S., Bui, H. H., Peake, D. A., Sanders, P. E., Thibodeaux, S. J., Chu, S., Qian, Y. W., Zhao, Y., Bredt, D. S., Moller, D. E., Konrad, R. J., Beigneux, A. P., Young, S. G. and Cao, G. (2008b). "AGPAT6 is a novel microsomal glycerol-3-phosphate acyltransferase." *J Biol Chem* 283(15): 10048-10057.

Chen, Z., Torrens, J. I., Anand, A., Spiegelman, B. M. and Friedman, J. M. (2005). "Krox20 stimulates adipogenesis via C/EBPbeta-dependent and -independent mechanisms." *Cell Metab* 1(2): 93-106.

Cheng, K. K., Lam, K. S., Wang, B. and Xu, A. (2014). "Signaling mechanisms underlying the insulin-sensitizing effects of adiponectin." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 28(1): 3-13.

Chmurzynska, A. (2006). "The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism." *J Appl Genet* 47(1): 39-48.

Christy, R. J., Yang, V. W., Ntambi, J. M., Geiman, D. E., Landschulz, W. H., Friedman, A. D., Nakabeppu, Y., Kelly, T. J. and Lane, M. D. (1989). "Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes." *Genes Dev* 3(9): 1323-1335.

Driscoll, S. D., Meininger, G. E., Lareau, M. T., Dolan, S. E., Killilea, K. M., Hadigan, C. M., Lloyd-Jones, D. M., Klibanski, A., Frontera, W. R. and Grinspoon, S. K. (2004). "Effects of exercise training and metformin on body composition and cardiovascular indices in HIV-infected patients." *AIDS* 18(3): 465-473.

Egawa, N. and Inoue, H. (2013). "[ALS disease modeling and drug screening using patient-specific iPS cells]." *Rinsho Shinkeigaku* 53(11): 1020-1022.

Elmqvist, J. K., Elias, C. F. and Saper, C. B. (1999). "From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight." *Neuron* 22(2): 221-232.

Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A. and Chen, J. (2001). "Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling." *Science* 294(5548): 1942-1945.

Fischer, P., Moller, P., Bindl, L., Melzner, I., Tornqvist, H., Debatin, K. M. and Wabitsch, M. (2002). "Induction of adipocyte differentiation by a thiazolidinedione in cultured, subepidermal, fibroblast-like cells of an infant with congenital generalized lipodystrophy." *J Clin Endocrinol Metab* 87(5): 2384-2390.

Forman, B. M., Chen, J. and Evans, R. M. (1997). "Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9): 4312-4317.

Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M. and Evans, R. M. (1995). "15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma." *Cell* 83(5): 803-812.

Fujimoto, T. and Ohsaki, Y. (2006). "Cytoplasmic lipid droplets: rediscovery of an old structure as a unique platform." *Ann N Y Acad Sci* 1086: 104-115.

Fujiwara, Y. (2008). "Cyclic phosphatidic acid - a unique bioactive phospholipid." *Biochim Biophys Acta* 1781(9): 519-524.

Gache, Y., Baldeschi, C., Del Rio, M., Gagnoux-Palacios, L., Larcher, F., Lacour, J. P. and Meneguzzi, G. (2004). "Construction of skin equivalents for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa." *Hum Gene Ther* 15(10): 921-933.

Galic, S., Oakhill, J. S. and Steinberg, G. R. (2010). "Adipose tissue as an endocrine organ." *Mol Cell Endocrinol* 316(2): 129-139.

Garg, A. (2000). "Lipodystrophies." *Am J Med* 108(2): 143-152.

Garg, A. (2004). "Acquired and inherited lipodystrophies." *N Engl J Med* 350(12): 1220-1234.

Garg, A. and Agarwal, A. K. (2009). "Lipodystrophies: disorders of adipose tissue biology." *Biochim Biophys Acta* 1791(6): 507-513.

Goldring, S. R., Stephenson, M. L., Downie, E., Krane, S. M. and Korn, J. H. (1990). "Heterogeneity in hormone responses and patterns of collagen synthesis in cloned dermal fibroblasts." *J Clin Invest* 85(3): 798-803.

Gomes, K. B., Fernandes, A. P., Ferreira, A. C., Pardini, H., Garg, A., Magre, J. and Pardini, V. C. (2004). "Mutations in the seipin and AGPAT2 genes clustering in consanguineous families with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy from two separate geographical regions of Brazil." *J Clin Endocrinol Metab* 89(1): 357-361.

Gosset, P., Charbonnier, A. S., Delerive, P., Fontaine, J., Staels, B., Pestel, J., Tonnel, A. B. and Trottein, F. (2001). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells." *Eur J Immunol* 31(10): 2857-2865.

Green, H. and Meuth, M. (1974). "An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture." *Cell* 3(2): 127-133.

Grigoriadis, A. E., Heersche, J. N. and Aubin, J. E. (1988). "Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone." *J Cell Biol* 106(6): 2139-2151.

Guo, W., Wong, S., Xie, W., Lei, T. and Luo, Z. (2007). "Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(2): E576-586.

Haque, W. A., Shimomura, I., Matsuzawa, Y. and Garg, A. (2002). "Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies." *J Clin Endocrinol Metab* 87(5): 2395.

Harris, P. K. and Kletzien, R. F. (1994). "Localization of a pioglitazone response element in the adipocyte fatty acid-binding protein gene." *Mol Pharmacol* 45(3): 439-445.

Hauner, H. and Loffler, G. (1986). "Adipogenic factors in human serum promote the adipose conversion of 3T3-L1 fibroblasts." *Int J Obes* 10(4): 323-330.

Hla, T., Lee, M. J., Ancellin, N., Paik, J. H. and Kluk, M. J. (2001). "Lysophospholipids--receptor revelations." *Science* 294(5548): 1875-1878.

Holcomb, I. N., Kabakoff, R. C., Chan, B., Baker, T. W., Gurney, A., Henzel, W., Nelson, C., Lowman, H. B., Wright, B. D., Skelton, N. J., Frantz, G. D., Tumas, D. B., Peale, F. V., Jr., Shelton, D. L. and Hebert, C. C. (2000). "FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family." *EMBO J* 19(15): 4046-4055.

Inampudi, P., Jacobson, J. A., Fessell, D. P., Carlos, R. C., Patel, S. V., Delaney-Sathy, L. O. and van Holsbeeck, M. T. (2004). "Soft-tissue lipomas: accuracy of sonography in diagnosis with pathologic correlation." *Radiology* 233(3): 763-767.

Jaager, K. and Neuman, T. (2011). "Human dermal fibroblasts exhibit delayed adipogenic differentiation compared with mesenchymal stem cells." *Stem Cells Dev* 20(8): 1327-1336.

Jones, S. P., Doran, D. A., Leatt, P. B., Maher, B. and Pirmohamed, M. (2001). "Short-term exercise training improves body composition and hyperlipidaemia in HIV-positive individuals with lipodystrophy." *AIDS* 15(15): 2049-2051.

Kadowaki, T. and Yamauchi, T. (2005). "Adiponectin and adiponectin receptors." *Endocr Rev* 26(3): 439-451.

Karbowska, A., Boratynska, M. and Klinger, M. (2009). "[Resistin: a pathogenic factor or a biomarker of metabolic disorders and inflammation?]." *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 63: 485-491.

Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K. and Wahli, W. (1993). "Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(6): 2160-2164.

Keskin, D., Ezirmik, N. and Celik, H. (2002). "Familial multiple lipomatosis." *Isr Med Assoc J* 4(12): 1121-1123.

Kim, K. H., Lee, K., Moon, Y. S. and Sul, H. S. (2001). "A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation." *J Biol Chem* 276(14): 11252-11256.

Kliwer, S. A., Forman, B. M., Blumberg, B., Ong, E. S., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D. J., Umesono, K. and Evans, R. M. (1994). "Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(15): 7355-7359.

Kliwer, S. A., Lenhard, J. M., Willson, T. M., Patel, I., Morris, D. C. and Lehmann, J. M. (1995). "A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation." *Cell* 83(5): 813-819.

Kliwer, S. A., Sundseth, S. S., Jones, S. A., Brown, P. J., Wisely, G. B., Koble, C. S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T. M., Lenhard, J. M. and Lehmann, J. M. (1997). "Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9): 4318-4323.

Krauss, R. M., Eckel, R. H., Howard, B., Appel, L. J., Daniels, S. R., Deckelbaum, R. J., Erdman, J. W., Jr., Kris-Etherton, P., Goldberg, I. J., Kotchen, T. A., Lichtenstein, A. H., Mitch, W. E., Mullis, R., Robinson, K., Wylie-Rosett, J., St Jeor, S., Suttie, J., Tribble, D. L. and Bazzarre, T. L. (2000). "AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association." *Circulation* 102(18): 2284-2299.

Krey, G., Braissant, O., L'Horsset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M. G. and Wahli, W. (1997). "Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay." *Mol Endocrinol* 11(6): 779-791.

Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Komeda, K., Satoh, S., Nakano, R., Ishii, C., Sugiyama, T., Eto, K., Tsubamoto, Y., Okuno, A., Murakami, K., Sekihara, H., Hasegawa, G., Naito, M., Toyoshima, Y., Tanaka, S., Shiota, K., Kitamura, T., Fujita, T., Ezaki, O., Aizawa, S., Kadowaki, T. and et al. (1999). "PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance." *Mol Cell* 4(4): 597-609.

Kuri-Harcuch, W. and Green, H. (1978). "Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(12): 6107-6109.

Kusminski, C. M., McTernan, P. G. and Kumar, S. (2005). "Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes." *Clin Sci (Lond)* 109(3): 243-256.

Lago, R. M., Singh, P. P. and Nesto, R. W. (2007). "Congestive heart failure and cardiovascular death in patients with prediabetes and type 2 diabetes given thiazolidinediones: a meta-analysis of randomised clinical trials." *Lancet* 370(9593): 1129-1136.

Larcher, F., Del Rio, M., Serrano, F., Segovia, J. C., Ramirez, A., Meana, A., Page, A., Abad, J. L., Gonzalez, M. A., Bueren, J., Bernad, A. and Jorcano, J. L. (2001). "A cutaneous gene therapy approach to human leptin deficiencies: correction of the murine ob/ob phenotype using leptin-targeted keratinocyte grafts." *FASEB J* 15(9): 1529-1538.

Lefterova, M. I., Zhang, Y., Steger, D. J., Schupp, M., Schug, J., Cristancho, A., Feng, D., Zhuo, D., Stoeckert, C. J., Jr., Liu, X. S. and Lazar, M. A. (2008). "PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale." *Genes Dev* 22(21): 2941-2952.

Lekstrom-Himes, J. and Xanthopoulos, K. G. (1998). "Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors." *J Biol Chem* 273(44): 28545-28548.

Leung, D. W. (2001). "The structure and functions of human lysophosphatidic acid acyltransferases." *Front Biosci* 6: D944-953.

Li, P., Carter, G., Romero, J., Gower, K. M., Watson, J., Patel, N. A. and Cooper, D. R. (2013). "Clk/STY (cdc2-like kinase 1) and Akt regulate alternative splicing and adipogenesis in 3T3-L1 pre-adipocytes." *PLoS One* 8(1): e53268.

Liang, W. C., Wang, Y., Wan, D. C., Yeung, V. S. and Waye, M. M. (2013). "Characterization of miR-210 in 3T3-L1 adipogenesis." *J Cell Biochem* 114(12): 2699-2707.

Linhart, H. G., Ishimura-Oka, K., DeMayo, F., Kibe, T., Repka, D., Poindexter, B., Bick, R. J. and Darlington, G. J. (2001). "C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(22): 12532-12537.

Lorenz, K., Sicker, M., Schmelzer, E., Rupf, T., Salvetter, J., Schulz-Siegmund, M. and Bader, A. (2008). "Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts." *Exp Dermatol* 17(11): 925-932.

Ludtke, A., Heck, K., Genschel, J., Mehnert, H., Spuler, S., Worman, H. J. and Schmidt, H. H. (2005). "Long-term treatment experience in a subject with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy: efficacy of rosiglitazone." *Diabet Med* 22(11): 1611-1613.

Lundin, C., Nordstrom, R., Wagner, K., Windpassinger, C., Andersson, H., von Heijne, G. and Nilsson, I. (2006). "Membrane topology of the human seipin protein." *FEBS Lett* 580(9): 2281-2284.

Lysy, P. A., Smets, F., Sibille, C., Najimi, M. and Sokal, E. M. (2007). "Human skin fibroblasts: From mesodermal to hepatocyte-like differentiation." *Hepatology* 46(5): 1574-1585.

Mackall, J. C., Student, A. K., Polakis, S. E. and Lane, M. D. (1976). "Induction of lipogenesis during differentiation in a "preadipocyte" cell line." *J Biol Chem* 251(20): 6462-6464.

Maebuchi, M., Machidori, M., Urade, R., Ogawa, T. and Moriyama, T. (2003). "Low resistin levels in adipose tissues and serum in high-fat fed mice and genetically obese mice: development of an ELISA system for quantification of resistin." *Arch Biochem Biophys* 416(2): 164-170.

Magre, J., Delapine, M., Khallouf, E., Gedde-Dahl, T., Jr., Van Maldergem, L., Sobel, E., Papp, J., Meier, M., Megarbane, A., Bachy, A., Verloes, A., d'Abronzio, F. H., Seemanova, E., Assan, R., Baudic, N., Bourut, C., Czernichow, P., Huet, F., Grigorescu, F., de Kerdanet, M., Lacombe, D., Labrune, P., Lanza, M., Loret, H., Matsuda, F., Navarro, J., Nivelon-Chevalier, A., Polak, M., Robert, J. J., Tric, P., Tubiana-Rufi, N., Vigouroux, C., Weissenbach, J., Savasta, S., Maassen, J. A., Trygstad, O., Bogalho, P., Freitas, P., Medina, J. L., Bonnicci, F., Joffe, B. I., Loyson, G., Panz, V. R., Raal, F. J., O'Rahilly, S., Stephenson, T., Kahn, C. R., Lathrop, M. and Capeau, J. (2001). "Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13." *Nat Genet* 28(4): 365-370.

Matsuda, M. and Shimomura, I. "Roles of adiponectin and oxidative stress in obesity-associated metabolic and cardiovascular diseases." *Rev Endocr Metab Disord* 15(1): 1-10.

Mavilio, F., Pellegrini, G., Ferrari, S., Di Nunzio, F., Di Iorio, E., Recchia, A., Maruggi, G., Ferrari, G., Provasi, E., Bonini, C., Capurro, S., Conti, A., Magnoni, C., Giannetti, A. and De Luca, M. (2006). "Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells." *Nat Med* 12(12): 1397-1402.

Montague, C. T., Farooqi, I. S., Whitehead, J. P., Soos, M. A., Rau, H., Wareham, N. J., Sewter, C. P., Digby, J. E., Mohammed, S. N., Hurst, J. A., Cheetham, C. H., Earley, A. R., Barnett, A. H., Prins, J. B. and O'Rahilly, S. (1997). "Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans." *Nature* 387(6636): 903-908.

Moreno, M. J. and Martinez, J. A. (2002). "[Adipose tissue: a storage and secretory organ]." *An Sist Sanit Navar* 25 Suppl 1: 29-39.

Mueller, E., Drori, S., Aiyer, A., Yie, J., Sarraf, P., Chen, H., Hauser, S., Rosen, E. D., Ge, K., Roeder, R. G. and Spiegelman, B. M. (2002). "Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms." *J Biol Chem* 277(44): 41925-41930.

Munzberg, H., Bjornholm, M., Bates, S. H. and Myers, M. G., Jr. (2005). "Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance." *Cell Mol Life Sci* 62(6): 642-652.

Musso, C., Cochran, E., Javor, E., Young, J., Depaoli, A. M. and Gorden, P. (2005). "The long-term effect of recombinant methionyl human leptin therapy on hyperandrogenism and menstrual function in female and pituitary function in male and female hypoleptinemic lipodystrophic patients." *Metabolism* 54(2): 255-263.

Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J. G., Chen, H. and Evans, R. M. (1998). "Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma." *Cell* 93(2): 229-240.

Natsuka, S., Akira, S., Nishio, Y., Hashimoto, S., Sugita, T., Isshiki, H. and Kishimoto, T. (1992). "Macrophage differentiation-specific expression of NF-IL6, a transcription factor for interleukin-6." *Blood* 79(2): 460-466.

Nedergaard, J., Bengtsson, T. and Cannon, B. (2007). "Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(2): E444-452.

Nissen, S. E. and Wolski, K. (2007). "Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes." *N Engl J Med* 356(24): 2457-2471.

Novelli, G. and Gruenert, D. C. (2002). "Genome medicine: gene therapy for the millennium." *Pharmacogenomics* 3(1): 15-18.

Oishi, Y., Manabe, I., Tobe, K., Tsushima, K., Shindo, T., Fujiu, K., Nishimura, G., Maemura, K., Yamauchi, T., Kubota, N., Suzuki, R., Kitamura, T., Akira, S., Kadowaki, T. and Nagai, R. (2005). "Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation." *Cell Metab* 1(1): 27-39.

Oral, E. A. and Chan, J. L. (2010). "Rationale for leptin-replacement therapy for severe lipodystrophy." *Endocr Pract* 16(2): 324-333.

Oral, E. A., Simha, V., Ruiz, E., Andewelt, A., Premkumar, A., Snell, P., Wagner, A. J., DePaoli, A. M., Reitman, M. L., Taylor, S. I., Gorden, P. and Garg, A. (2002). "Leptin-replacement therapy for lipodystrophy." *N Engl J Med* 346(8): 570-578.

Pages, C., Simon, M., Valet, P. and Saulnier-Blache, J. S. (2001). "Lysophosphatidic acid synthesis and release(1)." *Prostaglandins* 64(1-4): 1-10.

Payne, V. A., Grimsey, N., Tuthill, A., Virtue, S., Gray, S. L., Dalla Nora, E., Semple, R. K., O'Rahilly, S. and Rochford, J. J. (2008). "The human lipodystrophy gene BSCL2/seipin may be essential for normal adipocyte differentiation." *Diabetes* 57(8): 2055-2060.

Pedeutour, F. and Foa, C. (2002). "[From cytogenetics to cytogenomics of adipose tissue tumors: 1. Benign adipose tissue tumors]." *Bull Cancer* 89(7-8): 689-695.

Peng, J., Nemec, M., Brolese, E., Bosshardt, D. D., Schaller, B., Buser, D. and Gruber, R. (2014). "Bone-Conditioned Medium Inhibits Osteogenic and Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Cells In Vitro." *Clin Implant Dent Relat Res*.

Prasad, S. S., Garg, A. and Agarwal, A. K. (2011). "Enzymatic activities of the human AGPAT isoform 3 and isoform 5: localization of AGPAT5 to mitochondria." *J Lipid Res* 52(3): 451-462.

Prieur, X., Dollet, L., Takahashi, M., Nemani, M., Pillot, B., Le May, C., Mounier, C., Takigawa-Imamura, H., Zelenika, D., Matsuda, F., Feve, B., Capeau, J., Lathrop, M., Costet, P., Cariou, B. and Magre, J. (2013). "Thiazolidinediones partially reverse the metabolic disturbances observed in Bsc12/seipin-deficient mice." *Diabetologia* 56(8): 1813-1825.

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M. and Spiegelman, B. M. (1998). "A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis." *Cell* 92(6): 829-839.

Rajala, M. W., Qi, Y., Patel, H. R., Takahashi, N., Banerjee, R., Pajvani, U. B., Sinha, M. K., Gingerich, R. L., Scherer, P. E. and Ahima, R. S. (2004). "Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting." *Diabetes* 53(7): 1671-1679.

Raya, A., Rodriguez-Piza, I., Guenechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, M. J., Consiglio, A., Castilla, M., Rio, P., Sleep, E., Gonzalez, F., Tiscornia, G., Garreta, E., Aasen, T., Veiga, A., Verma, I. M., Surrallés, J., Bueren, J. and Izpisua Belmonte, J. C. (2009). "Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells." *Nature* 460(7251): 53-59.

Ren, D., Collingwood, T. N., Rebar, E. J., Wolffe, A. P. and Camp, H. S. (2002). "PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis." *Genes Dev* 16(1): 27-32.

Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C. M., Kalhan, S. C., Tilghman, S. M. and Hanson, R. W. (2003). "Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle." *J Biol Chem* 278(33): 30413-30416.

Rico, L., Del Rio, M., Bravo, A., Ramirez, A., Jorcano, J. L., Page, M. A. and Larcher, F. (2005). "Targeted overexpression of leptin to keratinocytes in transgenic mice results in lack of skin phenotype but induction of early leptin resistance." *Endocrinology* 146(10): 4167-4176.

Ricote, M., Huang, J., Fajas, L., Li, A., Welch, J., Najib, J., Witztum, J. L., Auwerx, J., Palinski, W. and Glass, C. K. (1998). "Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13): 7614-7619.

Robinson, G. W., Johnson, P. F., Hennighausen, L. and Sterneck, E. (1998). "The C/EBP β transcription factor regulates epithelial cell proliferation and differentiation in the mammary gland." *Genes Dev* 12(12): 1907-1916.

Ronfard, V., Rives, J. M., Neveux, Y., Carsin, H. and Barrandon, Y. (2000). "Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix." *Transplantation* 70(11): 1588-1598.

Rosen, E. D. and MacDougald, O. A. (2006). "Adipocyte differentiation from the inside out." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(12): 885-896.

Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M. and Mortensen, R. M. (1999). "PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro." *Mol Cell* 4(4): 611-617.

Rosen, E. D. and Spiegelman, B. M. (2006). "Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis." *Nature* 444(7121): 847-853.

Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P. and Spiegelman, B. M. (2000). "Transcriptional regulation of adipogenesis." *Genes Dev* 14(11): 1293-1307.

Ryan, E. A., Lakey, J. R., Rajotte, R. V., Korbitt, G. S., Kin, T., Imes, S., Rabinovitch, A., Elliott, J. F., Bigam, D., Kneteman, N. M., Warnock, G. L., Larsen, I. and Shapiro, A. M. (2001). "Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol." *Diabetes* 50(4): 710-719.

Sanchez-Munoz, F., Garcia-Macedo, R., Alarcon-Aguilar, F. and Cruz, M. (2005). "[Adipocytokines, adipose tissue and its relationship with immune system cells]." *Gac Med Mex* 141(6): 505-512.

Sankella, S., Garg, A., Horton, J. D. and Agarwal, A. K. (2014). "Hepatic gluconeogenesis is enhanced by phosphatidic acid which remains uninhibited by insulin in lipodystrophic Agpat2^{-/-} mice." *J Biol Chem* 289(8): 4762-4777.

Savage, D. B. and O'Rahilly, S. (2010). "Leptin therapy in lipodystrophy." *Diabetologia* 53(1): 7-9.

Scott, L. M., Civin, C. I., Rorth, P. and Friedman, A. D. (1992). "A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells." *Blood* 80(7): 1725-1735.

Scheja, L., Makowski, L., Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Shimshek, D. R., Meyers, D. S., Morgan, M., Parker, R. A. and Hotamisligil, G. S. (1999). "Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2^{-/-} mice." *Diabetes* 48(10): 1987-1994.

Scherer, P. E. (2006). "Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ." *Diabetes* 55(6): 1537-1545.

Schindler, K., Rieger, A., Tura, A., Gmeinhardt, B., Touzeau-Romer, V., Haider, D., Pacini, G. and Ludvik, B. (2009). "The effect of rosiglitazone on insulin sensitivity, beta cell function, bone mineral density, and body composition in hiv-positive patients on highly-active antiretroviral therapy (HAART)." *Horm Metab Res* 41(7): 573-579.

Schopfer, F. J., Lin, Y., Baker, P. R., Cui, T., Garcia-Barrio, M., Zhang, J., Chen, K., Chen, Y. E. and Freeman, B. A. (2005). "Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(7): 2340-2345.

Seagroves, T. N., Krnacik, S., Raught, B., Gay, J., Burgess-Beusse, B., Darlington, G. J. and Rosen, J. M. (1998). "C/EBPbeta, but not C/EBPalpha, is essential for ductal morphogenesis, lobuloalveolar proliferation, and functional differentiation in the mouse mammary gland." *Genes Dev* 12(12): 1917-1928.

Sears, I. B., MacGinnitie, M. A., Kovacs, L. G. and Graves, R. A. (1996). "Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma." *Mol Cell Biol* 16(7): 3410-3419.

Seip, M. and Trygstad, O. (1996). "Generalized lipodystrophy, congenital and acquired (lipoatrophy)." *Acta Paediatr Suppl* 413: 2-28.

Shimomura, I., Hammer, R. E., Ikemoto, S., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1999). "Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy." *Nature* 401(6748): 73-76.

Silswal, N., Singh, A. K., Aruna, B., Mukhopadhyay, S., Ghosh, S. and Ehtesham, N. Z. (2005). "Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway." *Biochem Biophys Res Commun* 334(4): 1092-1101.

Smathers, R. L. and Petersen, D. R. (2011). "The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions." *Hum Genomics* 5(3): 170-191.

Sorrell, J. M., Baber, M. A. and Caplan, A. I. (2007). "Clonal characterization of fibroblasts in the superficial layer of the adult human dermis." *Cell Tissue Res* 327(3): 499-510.

Sorrell, J. M., Baber, M. A. and Caplan, A. I. (2008). "Human dermal fibroblast subpopulations; differential interactions with vascular endothelial cells in coculture: nonsoluble factors in the extracellular matrix influence interactions." *Wound Repair Regen* 16(2): 300-309.

Spicer, L. J. and Francisco, C. C. (1997). "The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function." *Endocrinology* 138(8): 3374-3379.

St-Pierre, J. and Tremblay, M. L. (2012). "Modulation of leptin resistance by protein tyrosine phosphatases." *Cell Metab* 15(3): 292-297.

Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S. and Lazar, M. A. (2001). "The hormone resistin links obesity to diabetes." *Nature* 409(6818): 307-312.

Sterneck, E., Tassarollo, L. and Johnson, P. F. (1997). "An essential role for C/EBPbeta in female reproduction." *Genes Dev* 11(17): 2153-2162.

Subauste, A. R., Das, A. K., Li, X., Elliott, B. G., Evans, C., El Azzouny, M., Treutelaar, M., Oral, E., Leff, T. and Burant, C. F. (2012). "Alterations in lipid signaling underlie lipodystrophy secondary to AGPAT2 mutations." *Diabetes* 61(11): 2922-2931.

Sugii, S. and Evans, R. M. (2011). "Epigenetic codes of PPARgamma in metabolic disease." *FEBS Lett* 585(13): 2121-2128.

Szatmari, I., Gogolak, P., Im, J. S., Dezso, B., Rajnavolgyi, E. and Nagy, L. (2004). "Activation of PPARgamma specifies a dendritic cell subtype capable of enhanced induction of iNKT cell expansion." *Immunity* 21(1): 95-106.

Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T. and Akira, S. (1997). "Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene." *EMBO J* 16(24): 7432-7443.

Tang, Q. Q. and Lane, M. D. (1999). "Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation." *Genes Dev* 13(17): 2231-2241.

Tang, Q. Q., Zhang, J. W. and Daniel Lane, M. (2004). "Sequential gene promoter interactions of C/EBPbeta, C/EBPalpha, and PPARgamma during adipogenesis." *Biochem Biophys Res Commun* 319(1): 235-239.

Thompson, B. R., Lobo, S. and Bernlohr, D. A. (2010). "Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking." *Mol Cell Endocrinol* 318(1-2): 24-33.

Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R. A., Budavari, A. I. and Spiegelman, B. M. (1994a). "mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer." *Genes Dev* 8(10): 1224-1234.

Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B. M. (1994b). "Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor." *Cell* 79(7): 1147-1156.

Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G., Thomazy, V. A. and Evans, R. M. (1998). "PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL." *Cell* 93(2): 241-252.

Tontonoz, P. and Spiegelman, B. M. (2008). "Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma." *Annu Rev Biochem* 77: 289-312.

Toy, B. R. (2003). "Familial multiple lipomatosis." *Dermatol Online J* 9(4): 9.

Trujillo, M. E. and Scherer, P. E. (2006). "Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease." *Endocr Rev* 27(7): 762-778.

Tzamelis, I., Fang, H., Ollero, M., Shi, H., Hamm, J. K., Kievit, P., Hollenberg, A. N. and Flier, J. S. (2004). "Regulated production of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand during an early phase of adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes." *J Biol Chem* 279(34): 36093-36102.

Uysal, K. T., Scheja, L., Wiesbrock, S. M., Bonner-Weir, S. and Hotamisligil, G. S. (2000). "Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2." *Endocrinology* 141(9): 3388-3396.

Vaculik, C., Schuster, C., Bauer, W., Iram, N., Pfisterer, K., Kramer, G., Reinisch, A., Strunk, D. and Elbe-Burger, A. (2011). "Human dermis harbors distinct mesenchymal stromal cell subsets." *J Invest Dermatol* 132(3 Pt 1): 563-574.

Van Maldergem, L., Magre, J., Khallouf, T. E., Gedde-Dahl, T., Jr., Delepine, M., Trygstad, O., Seemanova, E., Stephenson, T., Albott, C. S., Bonnici, F., Panz, V. R., Medina, J. L., Bogalho, P., Huet,

F., Savasta, S., Verloes, A., Robert, J. J., Loret, H., De Kerdanet, M., Tubiana-Rufi, N., Megarbane, A., Maassen, J., Polak, M., Lacombe, D., Kahn, C. R., Silveira, E. L., D'Abronzio, F. H., Grigorescu, F., Lathrop, M., Capeau, J. and O'Rahilly, S. (2002). "Genotype-phenotype relationships in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy." *J Med Genet* 39(10): 722-733.

van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommerig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schrauwen, P. and Teule, G. J. (2009). "Cold-activated brown adipose tissue in healthy men." *N Engl J Med* 360(15): 1500-1508.

Victoria, B., Cabezas-Agricola, J. M., Gonzalez-Mendez, B., Lattanzi, G., Del Coco, R., Loidi, L., Barreiro, F., Calvo, C., Lado-Abeal, J. and Araujo-Vilar, D. (2010). "Reduced adipogenic gene expression in fibroblasts from a patient with type 2 congenital generalized lipodystrophy." *Diabet Med* 27(10): 1178-1187.

Vigouroux, C., Caron-Debarle, M., Le Dour, C., Magre, J. and Capeau, J. (2011). "Molecular mechanisms of human lipodystrophies: from adipocyte lipid droplet to oxidative stress and lipotoxicity." *Int J Biochem Cell Biol* 43(6): 862-876.

Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N. J., Enerback, S. and Nuutila, P. (2009). "Functional brown adipose tissue in healthy adults." *N Engl J Med* 360(15): 1518-1525.

Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W. and Ho, A. D. (2005). "Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood." *Exp Hematol* 33(11): 1402-1416.

Wang, L., Xu, S., Lee, J. E., Baldrige, A., Grullon, S., Peng, W. and Ge, K. (2013). "Histone H3K9 methyltransferase G9a represses PPARgamma expression and adipogenesis." *EMBO J* 32(1): 45-59.

Wauters, J. and Tavernier, J. (2011). "Leptin receptor signaling: pathways to leptin resistance." *Front Biosci (Landmark Ed)* 16: 2771-2793.

Weisiger, R. A. (2002). "Cytosolic fatty acid binding proteins catalyze two distinct steps in intracellular transport of their ligands." *Mol Cell Biochem* 239(1-2 Modulation): 35-43.

Williams, K. W., Scott, M. M. and Elmquist, J. K. (2011). " of the central melanocortin system by leptin, insulin, and serotonin: co-ordinated actions in a dispersed neuronal network." *Eur J Pharmacol* 660(1): 2-12.

Windpassinger, C., Auer-Grumbach, M., Irobi, J., Patel, H., Petek, E., Horl, G., Malli, R., Reed, J. A., Dierick, I., Verpoorten, N., Warner, T. T., Proukakis, C., Van den Bergh, P., Verellen, C., Van Maldergem, L., Merlini, L., De Jonghe, P., Timmerman, V., Crosby, A. H. and Wagner, K. (2004). "Heterozygous missense mutations in BSCL2 are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome." *Nat Genet* 36(3): 271-276.

Wolsk, E., Mygind, H., Grondahl, T. S., Pedersen, B. K. and van Hall, G. (2007). "Human skeletal muscle releases leptin in vivo." *Cytokine* 60(3): 667-673.

Wu, Z., Bucher, N. L. and Farmer, S. R. (1996). "Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids." *Mol Cell Biol* 16(8): 4128-4136.

Wu, Z., Xie, Y., Bucher, N. L. and Farmer, S. R. (1995). "Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis." *Genes Dev* 9(19): 2350-2363

Wu, Z., Xie, Y., Morrison, R. F., Bucher, N. L. and Farmer, S. R. (1998). "PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes." *J Clin Invest* 101(1): 22-32.

Xu, Y., Elmquist, J. K. and Fukuda, M. (2011). "Central nervous control of energy and glucose balance: focus on the central melanocortin system." *Ann N Y Acad Sci* 1243: 1-14.

Yaturu, S., Bryant, B. and Jain, S. K. (2007). "Thiazolidinedione treatment decreases bone mineral density in type 2 diabetic men." *Diabetes Care* 30(6): 1574-1576.

Zhang, C., Baker, D. L., Yasuda, S., Makarova, N., Balazs, L., Johnson, L. R., Marathe, G. K., McIntyre, T. M., Xu, Y., Prestwich, G. D., Byun, H. S., Bittman, R. and Tigyi, G. (2004a). "Lysophosphatidic acid induces neointima formation through PPARgamma activation." *J Exp Med* 199(6): 763-774.

Zhang, H. H., Huang, J., Duvel, K., Boback, B., Wu, S., Squillace, R. M., Wu, C. L. and Manning, B. D. (2009). "Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway." *PLoS One* 4(7): e6189.

Zhang, J. W., Klemm, D. J., Vinson, C. and Lane, M. D. (2004b). "Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis." *J Biol Chem* 279(6): 4471-4478.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* 372(6505): 425-432.

Zhu, S., Oh, H. S., Shim, M., Sterneck, E., Johnson, P. F. and Smart, R. C. (1999). "C/EBPbeta modulates the early events of keratinocyte differentiation involving growth arrest and keratin 1 and keratin 10 expression." *Mol Cell Biol* 19(10): 7181-7190.

Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J. R., Chen, X. N., Noya, D., Rao, M. S. and Reddy, J. K. (1995). "Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17): 7921-7925.

